



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

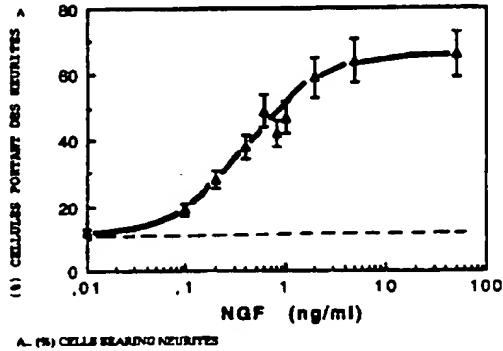
(51) Classification internationale des brevets 6 : C12N 15/86, 5/10, A61K 48/00, C07K 14/48, 14/075, 14/82	A1	(11) Numér de publication internationale: WO 96/11278 (43) Date de publication internationale: 18 avril 1996 (18.04.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01313		(74) Mandataire: CABINET ORES: 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).
(22) Date de dépôt international: 9 octobre 1995 (09.10.95)		
(30) Données relatives à la priorité: 94/12078 10 octobre 1994 (10.10.94) FR		(81) Etats désignés: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, MW, SD, SZ, UG).
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): AS-SOCIATION POUR LE DEVELOPPEMENT DE L'IMMUNOLOGIE MOLECULAIRE-ADIM [FR/FR]; 22, rue Méchain, F-75014 Paris (FR).		
(72) Inventeurs; et		Publiée
(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): CHAVEROT, Nathalie [FR/FR]; 10, rue Jeanne-d'Arc, F-75013 Paris (FR). COURAUD, Pierre-Olivier [FR/FR]; 9, rue du Perray, F-78610 Auffargis (FR). LATERRA, John [US/US]; 608 Hastings Road, Baltimore, MD 21286 (US). QUINONERO, Jérôme [FR/FR]; 5, cours du Lizard, F-77186 Noisy-le-Grand (FR). ROUX, Françoise [FR/FR]; 27, avenue d'Italie, F-75013 Paris (FR). STROSBERG, Arthur, Donny [BE/FR]; 66, rue de Javel, F-75015 Paris (FR). TCHELINGERIAN, Jean-Léon [FR/FR]; 44, rue de la Butte-aux-Cailles, F-75013 Paris (FR). VIGNAIS, Lionel [FR/FR]; 14, rue Domrémy, F-75013 Paris (FR).		Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.

(54) Title: IMMORTALIZED LINES OF ENDOTHELIAL BRAIN CELLS AND THERAPEUTICAL APPLICATIONS THEREOF

(54) Titre: LIGNEES IMMORTALISEES DE CELLULES ENDOTHELIALES CEREBRALES ET LEURS APPLICATIONS THERAPEUTIQUES

(57) Abstract

The invention relates to optionally modified immortalized lines of endothelial brain cells of mammals, as well as applications as preventive or curative drug and particularly for the treatment of primary and secondary, neurologic or psychiatric diseases, including brain tumors, and for stimulating the growth and reproduction of breeding animals. The invention also relates to the method for preparing said cell lines. The endothelial cell lines of mammals disclosed are comprised of immortalized endothelial brain cells presenting at least one of the following characteristics of differentiated endothelial brain cells, in a stable way: the expression of endothelial markers, the secretion of vasoactive substances, the expression of molecules of the major histocompatibility complex (MHC), the expression of hormonal receptors, and the existence of tight junctions; said cell lines comprise a nucleic acid fragment having at least one immortalizing fragment of a viral or cellular oncogene, optionally associated with at least one selection gene, and an expression vector comprising a sequence coding for a polypeptide, a protein or a viral vector, optionally associated with at least one selection gene and optionally at least one marker gene, and they are capable *in vivo* to integrate brain vessels of a host mammalian and produce said polypeptide, said protein or said viral vector.



(57) Abrégé

Lignées immortalisées de cellules endothéliales cérébrales de mammifères, éventuellement modifiées, ainsi que leurs applications comme médicament à visée préventive ou curative et notamment pour le traitement de différents troubles ou maladies primaires et secondaires, neurologiques ou psychiatriques, y compris les tumeurs cérébrales et pour la stimulation de la croissance et la reproduction des animaux d'élevage. Procédé de préparation desdites lignées. Lesdites lignées de cellules endothéliales de mammifères, sont constituées par des cellules endothéliales cérébrales immortalisées, présentant au moins l'une des caractéristiques suivantes des cellules endothéliales cérébrales différenciées, de manière stable: l'expression de marqueurs endothéliaux, la sécrétion de substances vasoactives, l'expression de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), l'expression de récepteurs hormonaux, et l'existence de jonctions serrées, comprennent un fragment d'acide nucléique comprenant au moins un fragment immortalisant d'un oncogène viral ou cellulaire, éventuellement associé à au moins un gène de sélection, et un vecteur d'expression comprenant une séquence codant pour un polypeptide, une protéine ou un vecteur viral, éventuellement associé à au moins un gène de sélection et éventuellement au moins un gène marqueur et sont capables *in vivo* de s'intégrer aux vaisseaux cérébraux d'un mammifère hôte et de produire ledit polypeptide, ladite protéine ou ledit vecteur viral.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

Lignées immortalisées de cellules endothéliales cérébrales et leurs applications thérapeutiques

5 La présente invention est relative à des lignées immortalisées de cellules endothéliales cérébrales de mammifères, éventuellement modifiées, ainsi qu'à leurs applications comme médicament à visée préventive ou curative et notamment pour le traitement de différents troubles ou maladies primaires et secondaires, neurologiques ou psychiatriques, y compris les tumeurs cérébrales.

10 Depuis quelques années, de nouvelles méthodes de traitement d'un certain nombre de troubles neurologiques, antérieurement considérés comme réfractaires à tous les traitements conventionnels, font appel à la thérapie génique. Ces nouvelles méthodes sont liées notamment aux progrès réalisés dans le domaine de la construction de vecteurs d'expression efficaces, de transporteurs de transgènes viraux et cellulaires et dans la caractérisation 15 de cellules cibles appropriées à la thérapie génique du système nerveux.

20 Deux approches différentes sont essentiellement proposées pour réaliser le transfert de gènes dans le système nerveux : une approche dite *in vivo* qui est concentrée sur le transfert direct du matériel génétique aux cellules *in vivo*, en utilisant des agents viraux et chimiques et une approche *ex vivo*, qui se caractérise en ce que le transfert génique est effectué dans des cellules en culture, qui sont ensuite implantées dans l'organisme hôte. Cette dernière approche comprend des étapes de manipulations moléculaires, de clonage et 25 d'implantation des cellules, de manière à permettre la distribution des substances actives chez l'hôte (SUHR S.T. et al., Arch. Neurol., 1993, 50, 1252-1268).

30 De nombreux troubles neurologiques sont en rapport avec des lésions ou dysfonctions focalisées du système nerveux et ont donc été choisis pour tester ces techniques.

Les premiers essais, dans ce domaine ont essentiellement concernés des maladies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson et comprennent la greffe intracérébrale de tissu neural foetal ou de tissu médullo-surrénalien dans le cerveau (BJÖRKLUND A., TINS, 1991, 14, 8, 319-322).

L'utilisation de tissus nerveux primaires d'origine foetale, pour la transplantation cellulaire en thérapie humaine est une source de nombreux problèmes éthiques et pratiques ; une alternative à ce problème est l'utilisation de lignées cellulaires primaires d'origine neurale (neurones, cellules gliales, astrocytes par exemple) ou de lignées cellulaires non neurales (fibroblastes, myoblastes, cellules chromaffines de la médulo-surrénale, hépatocytes, par exemple) (GAGE FH et al., Trends Neurosci., 1991, 14, 328-333). Bien que les lignées cellulaires de médulo-surrénale, de fibroblastes ou de myoblastes puissent effectivement libérer des substances actives *in vivo*, elles ne sont pas normalement présentes dans le système nerveux, peuvent modifier la fonction normale du système nerveux et entraîner une réaction de rejet.

Or, dans le but de traiter des troubles ou maladies neurologiques ou psychiatriques, y compris des tumeurs cérébrales, délimités ou non à une zone spécifique du cerveau, il est nécessaire de disposer d'un vecteur cellulaire qui puisse parfaitement s'intégrer au tissu nerveux, tout en exprimant, de manière stable, une substance bioactive, notamment une protéine.

En conséquence, les Inventeurs se sont donné pour but de pourvoir à un vecteur cellulaire qui répond mieux aux besoins de la pratique, notamment en ce qu'il exprime, de manière stable et *in vivo*, au moins un polypeptide ou une protéine, préalablement sélectionné ou un vecteur viral, en ce qu'il soit d'origine cérébrale, capable de s'intégrer à la vascularisation cérébrale normale et en ce qu'il soit bien toléré.

La présente invention a pour objet des lignées de cellules endothéliales de mammifères, caractérisées :

. en ce qu'elles sont constituées par des cellules endothéliales cérébrales immortalisées, présentant au moins l'une des caractéristiques suivantes des cellules endothéliales cérébrales différenciées, de manière stable :

10 - l'expression de marqueurs endothéliaux,
- la sécrétion de substances vasoactives,
- l'expression de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH),

. en ce qu'elles comprennent un fragment d'acide nucléique comprenant au moins un fragment immortalisant d'un oncogène viral ou cellulaire, éventuellement associé à au moins un gène de sélection, et un vecteur d'expression comprenant une séquence codant pour un polypeptide, une protéine ou un vecteur viral, éventuellement associé à au moins un gène de sélection et éventuellement au moins un gène marqueur et

15 . en ce qu'elles sont capables *in vivo* de s'intégrer aux vaisseaux cérébraux d'un mammifère hôte et de produire ledit polypeptide, ladite protéine ou ledit vecteur viral.

20 . en ce qu'elles sont capables *in vivo* de s'intégrer aux vaisseaux cérébraux d'un mammifère hôte et de produire ledit polypeptide, ladite protéine ou ledit vecteur viral.

25 On entend, au sens de la présente invention, par vecteur d'expression, tout fragment d'acide nucléique intégré dans le génome ou présent au niveau cytoplasmique, et capable de permettre l'expression desdits polypeptide, protéine ou vecteur viral.

Selon un mode de réalisation avantageux desdites lignées, le fragment d'acide nucléique comprenant au moins un fragment immortalisant d'un oncogène contient le gène de la résistance à la néomycine et un fragment de l'oncogène T de SV40.

Selon un autre mode de réalisation avantageux desdites lignées, le fragment d'acide nucléique comprenant au moins un fragment immortalisant d'un oncogène

contient la région précoce E1A du génome de l'adénovirus 2 et le gène de résistance à la néomycine.

Selon un autre mode de réalisation avantageux desdites lignées, ledit vecteur d'expression est un vecteur rétroviral, notamment un vecteur MFG.
5

De manière préférée, le vecteur rétroviral est un vecteur MFG-NB défectif pour la réPLICATION.

Lesdits vecteurs sont notamment décrits dans MULLIGAN et al. (Proc. Nat. Ac. Sci. USA, 1984, 81, 6349-10 6353) et FERRY et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 88, 8377-8381).

Egalement de manière préférée, lesdites cellules endothéliales sont des cellules de capillaires cérébraux.

15 Des essais mettant en oeuvre des cellules endothéliales primaires vasculaires non immortalisées périphériques ont été décrits, mais ne constituent pas un vecteur approprié, en ce qu'elles ne constituent pas une source pure, homogène et suffisante, en vue d'une application 20 reproductible aux transplantations et en ce qu'elles ne présentent pas le phénotype endothérial cérébral.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux desdites lignées cellulaires, la séquence codant pour un polypeptide ou une protéine est sélectionnée parmi les séquences codant pour : des enzymes, telles que des protéases, des inhibiteurs d'enzymes, tels que des inhibiteurs de protéases, des cytokines, des neurotransmetteurs, des neurotrophines, des facteurs de croissance, des toxines, des antimétabolites, des neurohormones, des gangliosides, des antibiotiques, des facteurs thrombolytiques, des facteurs coagulants, des facteurs vasodilatateurs ou vasoconstricteurs, des facteurs hypo- 30 ou hypercholestérolémiant, des facteurs hyper- ou hypoglycémiant ou toute autre substance d'intérêt.

Conformément à l'invention, lesdites cellules endothéliales comprennent avantageusement, en tant que fragment immortalisant, la région précoce E1A du génome

de l'adénovirus 2 et le gène de résistance à la néomycine et en tant que vecteur d'expression, un vecteur rétroviral MFG-NB contenant le gène nls-lacZ codant pour la β -galactosidase. Cette lignée cellulaire a été dénommée RBEZ 5 par les Inventeurs.

Conformément à l'invention, ladite lignée a été déposée sous le n° I-1481 en date du 10 octobre 1994 auprès de la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes tenue par l'Institut Pasteur.

10 Egalement conformément à l'invention, lesdites cellules endothéliales comprennent avantageusement, en tant que fragment immortalisant, la région précoce E1A du génome de l'adénovirus 2 et le gène de résistance à la néomycine et en tant que vecteur, un vecteur rétroviral 15 pMoMuLVisisNGF codant pour le β -NGF murin.

Cette lignée cellulaire a été dénommée RBE/NGF-4 par les Inventeurs.

Conformément à l'invention, ladite lignée a été déposée sous le n° I-1482 en date du 10 octobre 1994 20 auprès de la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes tenue par l'Institut Pasteur.

De manière inattendue, de telles cellules endothéliales de capillaires cérébraux s'intègrent bien à la vascularisation cérébrale, sont très bien tolérées et 25 libèrent, *in vivo*, sur une longue période, la substance active qu'elles expriment et trouvent application à la préparation d'une composition pour le traitement des troubles ou maladies primaires et secondaires neurologiques ou psychiatriques, y compris les tumeurs cérébrales ou pour stimuler la croissance et la reproduction 30 des animaux d'élevage (volailles, ovins, bovins, porcins, équidés, lagomorphes, rongeurs etc...).

En particulier, dans le noyau basal et dans le striatum, de nombreuses cellules endothéliales greffées 35 conformes à l'invention adoptent une localisation vasculaire. Dans les deux sites d'implantation un nombre non négligeable de cellules greffées ne sont pas associées au

réseau vasculaire de l'hôte. Cette localisation non vasculaire n'entraîne pas une exacerbation de la mort cellulaire et ceci encore à 1 an après l'implantation.

Conformément à l'invention, le vecteur viral
5 est avantageusement un cytomégalovirus (CMV) modifié (vecteur viral intégratif).

La présente invention a également pour objet des compositions, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une lignée de cellules endothéliales cérébrales conformes à l'invention, associée à au moins un 10 véhicule pharmaceutiquement acceptable.

De telles compositions contiennent de préférence entre 10^4 et 10^5 cellules endothéliales/ μl .

De telles compositions peuvent être avantageusement administrées par voie intracrânienne, voie sous-cutanée, voie intra-cérébroventriculaire, voie subdurale, voie veineuse ou artérielle (intracarotide, par exemple), voie intramusculaire, voie intrathécale.

Conformément à l'invention, lesdites cellules endothéliales peuvent être des cellules de même espèce que l'hôte (allogreffe ou homogreffe) ou d'espèce différente (xénogreffe).

La présente invention a également pour objet un procédé d'obtention d'une lignée cellulaire modifiée 25 conforme à l'invention, lequel procédé est caractérisé en ce que:

- (1) on réalise une première transfection par :
 - culture de cellules endothéliales cérébrales, de préférence de microvaisseaux cérébraux, dans 30 un milieu de culture convenable, supplémenté en sérum et en facteurs de croissance,
 - transfection desdites cellules entre le 2ème et le 6ème passage avec un fragment d'acide nucléique comprenant au moins un fragment immortalisant d'un onco-gène viral ou cellulaire et éventuellement au moins un gène de sélection, notamment un gène codant pour la résistance à un antibiotique,

- sélection des cellules transfectées sur un milieu de sélection adapté audit gène de sélection, si nécessaire,

5 (2) puis on réalise une transfection des cellules obtenues en (1) avec un vecteur contenant la séquence de polypeptide ou de protéine à produire ou un vecteur viral à exprimer.

10 De manière préférée, la transfection de l'étape (2) est réalisée avec un vecteur rétroviral dans lequel la séquence codant pour la protéine à exprimer a été préalablement incorporée.

15 De manière préférée, l'étape (1) permet d'obtenir des cellules RBE4, immortalisées par transfection avec un plasmide contenant la région précoce E1A du génome de l'adénovirus 2 et le gène de résistance à la néomycine sous contrôle du promoteur SV40, qui sont déposées sous le n° I-1142 auprès de la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM) tenue par l'Institut Pasteur.

20 La présente invention a également pour objet un modèle d'étude de l'intégration cérébrale de cellules vectrices de substances actives, au niveau du cerveau, caractérisé en ce qu'il comprend une lignée cellulaire REBZ, conforme à l'invention.

25 La présente invention a également pour objet un modèle d'étude et d'identification des systèmes biochimiques et cellulaires de la barrière hémato-encéphalique *in vitro*, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une lignée cellulaire conforme à l'invention.

30 La présente invention a, en outre, pour objet un procédé de production d'un polypeptide ou d'une protéine, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en oeuvre d'au moins une lignée de cellules endothéliales conforme à l'invention, dans un bioréacteur convenable.

35 Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de

la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 illustre l'étude *in vitro* de l'expression du transgène NGF dans les cellules RBE/NGF,
5 par hybridation *in situ* ;

- les figures 2 et 3 illustrent la stimulation du bourgeonnement axonal de cellules PC12, obtenue à partir du surnageant des cellules RBE/NGF, *in vitro* ;

10 - la figure 4 illustre le prémarquage des cellules RBE4 avant la transplantation, par le colorant nucléaire HOECHST 33342 (bisbenzimide) ;

- la figure 5 illustre la visualisation des cellules prémarquées au colorant Hoechst, après transplantation dans le cerveau de rat adulte ;

15 - la figure 6 illustre l'étude de l'intégration morphologique et fonctionnelle des cellules RBEZ par visualisation de l'expression du transgène nls-lacZ et du marqueur antigénique d'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (BHE), l'EBA (*endothelial barrier antigen*) ;

20 - la figure 7 illustre l'étude ultrastructurale en microscopie électronique, démontrant l'intégration morphologique et fonctionnelle des cellules RBEZ après greffe intracérébrale par visualisation de l'expression du transgène nls-lacZ ;

25 - la figure 8 illustre l'étude de l'intégration morphologique et fonctionnelle des cellules RBEZ après greffe dans une tumeur intracérébrale, par visualisation de l'expression du transgène nls-lacZ ;

30 - la figure 9 illustre l'identification du gène nls-LacZ dans des tumeurs implantées avec des cellules RBEZ, par PCR .

35 - la figure 10 illustre l'étude *in vivo* de l'expression du transgène NGF dans les cellules RBE/NGF, trois semaines après transplantation dans le *nucleus basalis* (noyau basal) ;

- la figure 11 illustre les structures cérébrales témoins utilisées comme contrôle interne de l'hybridation *in situ* du messager NGF, *in vivo* ;

5 - la figure 12 illustre l'effet biologique du NGF sécrété par les cellules RBE/NGF, trois semaines après la greffe, au niveau du *nucleus basalis* ;

- la figure 13 illustre l'effet biologique du NGF sécrété par les cellules RBE/NGF, trois semaines après la greffe, à distance du *nucleus basalis* ;

10 - la figure 14 illustre la quantification de l'effet biologique induit par l'expression du transgène NGF à 3 et 8 semaines post-greffé et ceci est traduit par la surface occupée par l'immunomarquage p75LNGFR par rapport à la surface du greffon.

15 Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1 : Préparation des cellules endothéliales cérébrales immortalisées RBE4.

20 Des cellules endothéliales de microvaisseaux de cerveaux de rats (culture primaire) sont immortalisées par transfection avec le plasmide pE1A-néo, contenant la séquence codant pour l'adénovirus E1A, suivie par le gène de résistance à la néomycine.

25 Un clone, dénommé RBE4, a été ainsi obtenu et ses caractéristiques sont en particulier décrites dans la Demande PCT WO 93/06222 ainsi que dans les articles parus dans J. Cell. Physiol., 1993, 155, 104-111 et J. Cell. Physiol., 1994, 159, 101-113. Ce clone a été déposé sous le n° I-11142 à la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM).

30 Pour réaliser la transfection, la technique de co-précipitation au phosphate de calcium a été utilisée, comme décrit dans la Demande PCT WO 93/06222 et rappelé ci-après : la transfection desdites cellules est réalisée au 5ème passage avec le plasmide précité (10 µg) conte-

nant, outre la région précoce E1A du génome de l'adénovirus 2 et le gène de résistance à la néomycine, le promoteur SV40.

Cette transfection a lieu après mise en culture de ces cellules dans des boîtes recouvertes de collagène, contenant un milieu α -MEM/F10 (2/3 ; 1/3), supplémenté en sérum de veau foetal (SVF) à 10 %, en FGFb 1 ng/ml, en glutamine (2 mM) et en pénicilline/streptomycine. La lignée cellulaire obtenue possède certaines des caractéristiques des cellules endothéliales cérébrales ; elle possède notamment un phénotype non transformé : inhibition de contact, prolifération dépendant des facteurs de croissance et d'adhérence, expression de marqueurs de différenciation endothéliales (antigène apparenté au facteur VIII), site de liaison à l'agglutinine de *Griffonia simplicifolia* et non-tumorigénérité chez les souris Nude.

De plus, ces cellules sont stimulées par les astrocytes pour exprimer les marqueurs enzymatiques spécifiques de la barrière hémato-encéphalique, à savoir, la γ -glutamine transférase et la phosphatase alcaline.

EXEMPLE 2 : Préparation des cellules endothéliales cérébrales RBEZ.

Les cellules RBE4 obtenues à l'exemple 1 sont soumises à deux passages par semaine, sur un milieu α -MEM/F10 (1/1 ; Seromed, France), supplémenté en glutamine 2 mM, sérum de veau foetal à 10 %, FGFb 1 ng/ml et G418 300 μ g/ml.

Elles sont étalées à une densité de 30 10^4 cellules/cm² sur des boîtes recouvertes de collagène et utilisées entre les passages 30 et 60.

1) Préparation du vecteur rétroviral :

Un vecteur MFG-NB, défectif pour la réPLICATION, et contenant le gène lacZ est obtenu par insertion de la séquence codant pour la β -galactosidase d'*E. coli*, fusionnée à une séquence codant pour la séquence de localisation nucléaire (nls) de 21 aminoacides, issue de

l'antigène T de SV40 (Kalderon D. et al., Cell, 1984, 39, 499-509). Ce vecteur MFG-NB nls-lacZ est introduit dans des cellules productrices de rétrovirus ψ -2 (Mulligan et al., précité) (infection rétrovirale recombinante de ψ -2) et permet d'obtenir des lignées cellulaires ψ -2-MFG-NB.

Ces cellules productrices de rétrovirus sont étalées en boîte à une densité de 10^6 cellules pour des boîtes de 100 mm de diamètre, dans 7 ml d'un milieu RPMI 1640, supplémenté en sérum de veau foetal à 10 %.

Après 24 h, un volume de 6 ml de milieu contenant le virus est filtré et utilisé pour l'infection ou bien stocké à -80°C jusqu'à son utilisation.

2) Infection des cellules endothéliales RBE4 :

Les cellules RBE4 sont étalées sur boîte à une densité de 10^4 cellules/cm² et après 24 h, le virus (3 ml) est ajouté en présence de polybrène (10 µg/ml) pendant 2 h.

Après une autre période de 24 h dans un milieu complet, les cellules RBE4 sont repiquées et réinfectées dans les mêmes conditions.

3) Sélection des cellules endothéliales exprimant le transgène :

Les cellules exprimant la β -galactosidase (cellules RBEZ) sont triées par FACS (fluorescent activated cell sorting ; NOLAN et al., PNAS, 1988, 85, 2603-2607), en utilisant, comme substrat de l'enzyme, la β -D-galactopyranoside fluorescéine (FDG).

Conformément à cette technique, 10^6 cellules RBEZ dans 100 µl, sont incubées à 37°C pendant 5 min, dans un tube en polystyrène de 5 ml, avant l'addition de 100 µl de FDG (2 mM).

Après mélange, les cellules sont placées à nouveau à 37°C pendant 1 min, puis sur de la glace, et le volume est ajusté à 2 ml.

4) Détection de l'expression du transgène par visualisation de l'activité enzymatique de la β-galactosidase, à l'aide d'un substrat chromogène, le X-gal.

. Protocole :

5 L'activité enzymatique est détectée par incubation des cellules à 37°C, dans un tampon PBS contenant du 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-gal) 2 mM, du ferricyanure de potassium 20 mM, du ferrocyanure de potassium 20 mM et du MgCl₂, 2 mM.

10 . Résultats :

La présence d'une activité enzymatique β-galactosidase se révèle par la formation d'une coloration bleue. Environ 50-80% des cellules endothéliales RBE4 infectées par le rétrovirus se colorent en bleu lors de 15 l'histochimie, mais le niveau de coloration varie d'une cellule à l'autre. Les cellules RBE4 témoins (non infectées) ne sont pas colorées, dans les mêmes conditions.

5) Propriétés des cellules RBEZ in vitro :

- Les cellules RBEZ obtenues sont cultivées 20 sur un support recouvert de collagène dans un milieu α-MEM/F10, supplémenté en sérum de veau foetal à 10 %, glutamine 2mM, FGFb 1 ng/ml et G418 300 µg/ml.

Ces cellules présentent une inhibition de contact et une prolifération dépendant des facteurs de 25 croissance et d'adhérence ; elles expriment, en outre, des marqueurs de différenciation endothéliale.

EXEMPLE 3 : Préparation des cellules endothéliales cérébrales RBE/NGF.

Les cellules RBE4 obtenues à l'exemple 1 sont 30 soumises à deux passages par semaine, sur un milieu α-MEM/F10 (1/1 ; Seromed, France), supplémenté en glutamine 2 mM, sérum de veau foetal à 10 % et FGFb 1 ng/ml et G418 300 µg/ml.

Elles sont étalées à une densité de 35 10⁴ cellules/cm² sur des boîtes recouvertes de collagène et utilisées entre les passages 30 et 60.

1) Préparation du vecteur rétroviral :

On procède comme à l'exemple 2, en utilisant un vecteur rétroviral pMoMuLVisisNGF, déficient pour la réPLICATION et dans lequel la séquence codant pour le β -NGF de souris est insérée (Scott J et al., Nature, 1983, 302, 538-540). Ce vecteur, introduit dans des cellules productrices ψ -2, permet d'obtenir des lignées cellulaires ψ -2-MoMuLVisisNGF.

2) Infection des cellules endothéliales RBE4 :

10 On procède comme à l'exemple 2.

3) Sélection des cellules endothéliales exprimant le transgène par une méthode ELISA bi-site :

A la suite de sous-clonages des cellules RBE4 infectées par la méthode des dilutions limites, les sous-clones sécrétant du β NGF (cellules RBE/NGF) sont identifiés en utilisant un ELISA bi-site (LADENHEIM et al., J. Neurochem., 1993, 60, 260-266).

De manière plus précise, un anticorps monoclonal anti- β NGF, dénommé 27/21 (0,1 mg/ml dans un tampon carbonate 0,05 M pH 9,6), est appliqué sur des plaques EIA/RIA Costar pendant 2 heures à 37°C. Les plaques sont lavées 3 fois avec un mélange de Tris HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 200 mM, CaCl₂ 10 mM, Triton X-100 à 0,1 %, et azoture de sodium à 0,05% et incubées à 4°C pendant une nuit dans un milieu conditionné ou des standards β NGF (30-1000 pg/ml) dans le même tampon supplémenté avec de la sérum albumine bovine à 1%.

Après lavages, le β NGF est détecté à l'aide du même anticorps conjugué à la β -D-galactosidase (400 mU/ml), après incubation pendant 4 heures à 37°C. Le substrat chromogénique est du chlorophénol-rouge- β -galactopyranoside (1 mg/ml dans un milieu Hepes 100 mM, pH 7, NaCl 150 mM, MgCl₂ 2 mM, azoture de sodium 0,1%). L'absorbance à 570 nm est lue après 2 heures à 37°C. Deux sous-clones hautement positifs dénommés RBE/NGF-2 et -4

sont sélectionnés, ainsi que deux sous-clones moins positifs, et ce parmi 94 clones testés.

4) Détection cellulaire de la synthèse de NGF par hybridation *in situ* de la séquence nucléotidique 5 (ARNm) codant pour le NGF.

Une hybridation *in situ* est réalisée avec une sonde de 48 mers, antisens et spécifique de la séquence nucléotidique (ARNm) codant pour le β NGF, correspondant aux positions 897-944 de la séquence d'ADNc du β NGF de 10 souris (SCOTT et al, 1983, Nature 302, 538-540), de formule suivante :

48 mer antisens 5' - 3' NGF mature

5' CTG CTT CTC ATC TGT TGT CAA CGC CTT GAC GAA
GGT GTG AGT CGT GGT 3',

15 de manière à visualiser le transcrit β NGF dans les cellules infectées, en culture. Ces résultats montrent une expression importante d'ARNm du β NGF dans les cellules infectées, à un niveau variable, d'une cellule à l'autre.

La figure 1 illustre l'étude *in vitro* de 20 l'expression du transgène NGF dans les cellules RBE/NGF, par hybridation *in situ*.

La visualisation immuno-enzymatique de l'expression du transgène NGF est réalisée à l'aide d'une sonde oligonucléotidique antisens spécifique du NGF 25 murin, marquée à la digoxigénine. Dans ces conditions, les hybrides ARNm/sonde NGF sont révélés par un anticorps anti-digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline, dont la réaction enzymatique avec le complexe de substrats NBT-BCIP, produit un précipité noirâtre. La figure 1A 30 montre un signal intense dans les cellules RBE/NGF en culture, indiquant un fort niveau d'expression du transgène NGF. En 1B, l'absence de positivité dans les cellules RBE4 témoins, non-infectées est observée (x300 en 1A et 1B) (1B en contraste de phase).

4) Activité in vitro du NGF sécrété :

L'activité biologique du NGF sécrété dans le surnageant des cellules RBE/NGF est mise en évidence par la propriété de promouvoir un bourgeonnement des neurites des cellules PC12 de phéochromocytome de rat. Pour réaliser ce test, les cellules RBE/NGF sont étalées sur boîtes à une densité de $10^4/\text{cm}^2$ dans des boîtes de 100 mm de diamètre et la croissance est réalisée pendant 3 à 4 jours jusqu'à confluence (10^7 cellules/boîte). Le milieu est changé (10 ml) et les surnageants sont collectés après 24 heures. Les résultats sont illustrés aux figures 2 et 3, qui montrent que le surnageant cellulaire de 24 heures se comporte de la même manière que du NGF purifié (0,1-50 ng/ml), utilisé comme standard interne et conduit à une stimulation du bourgeonnement neuritique chez environ 65% des cellules PC12. En outre, une dilution au 1:40 dudit surnageant présente une activité biologique comparable à du NGF à 0,4 ng/ml (40% de cellules porteuses de neurites). En conséquence, la capacité de sécrétion de NGF biologiquement actif par les cellules RBE/NGF peut être estimée à 16 ng/ 10^6 cellules/24 heures.

Ces figures 2 et 3 comportent en abscisse, la concentration en NGF (ng/ml) (figure 2) ou le taux de dilution (figure 3 ; courbe 1 : cellules RBE/NGF et courbe 2 : cellules RBE4) et en ordonnée, le pourcentage de cellules portant des neurites.

EXEMPLE 4 : Implantation cérébrale des cellules RBE4, RBEZ et RBE-NGF.

I. Cellules RBE4 : survie et intégration.

Pour la caractérisation des lignées cellulaires RBE4 transplantées dans le cerveau de rat adulte, une méthode de prémarquage au bisbenzimide Hoechst est utilisée, pour suivre les cellules greffées (GANSMÜLLER et al., GLIA, 1991, 4, 580-590).

La figure 4 illustre le prémarquage des cellules RBE4, avant la transplantation, par le colorant nucléaire HOECHST 33342 (bisbenzimide). Les cellules en suspension sont visualisées en microscopie à fluores-

cence, sous lumière ultra-violette. La fluorescence du colorant définit clairement les noyaux cellulaires positivement marqués (x270).

Trois à huit semaines après implantation des 5 cellules RBE4 marquées, dans différentes régions du cerveau (substance grise et substance blanche), le greffon a un aspect compact avec un étalement faible et constant de certaines cellules RBE4, autour de sa masse. Cette migration se fait essentiellement le long du réseau vasculaire de l'hôte, suggérant une interaction préférentielle entre les cellules endothéliales implantées et les éléments vasculaires de l'hôte.

Les colorations histologiques des cerveaux ainsi greffés montrent un minimum de signes de cellules 15 nécrotique, et ce essentiellement durant la première semaine qui suit le traumatisme chirurgical dû à la transplantation.

A l'intérieur du greffon, la densité cellulaire est homogène (peu ou absence de cellules pycnotiques). L'immunoréactivité GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), caractéristique des astrocytes, est importante, dès 20 1 semaine après l'implantation, aussi bien autour du greffon que dans le greffon lui-même, indiquant une infiltration d'astrocytes dans ce dernier.

25 De manière inattendue, les cellules RBE4 implantées migrent et s'intègrent à l'environnement vasculaire avec quelquefois une participation directe au réseau vasculaire de l'hôte.

Les figures 5A, 5B et 5C montrent les cellules 30 prémarquées au colorant Hoechst, après transplantation dans le cerveau de rat adulte. La figure 5A montre une vue générale de la zone de greffe dans le parenchyme cérébral. Les cellules endothéliales greffées fluorescentes semblent s'accumuler préférentiellement autour 35 d'éléments vasculaires du cerveau hôte. Les astérisques matérialisent le trajet d'un vaisseau sanguin (x250). Les figures 5B et 5C montrent un vaisseau sanguin à fort grossissement, situé dans la zone d'implantation du gref-

fon. En 5B, de nombreuses cellules RBE4 Hoechst positives intégrées en position lumineuse (flèches) et péri-vasculaire peuvent être observées. En 5C, ce même vaisseau est immunomarqué par un anticorps anti-laminine (marqueur spécifique des vaisseaux sanguins) (x600).

II. Cellules RBEZ : survie, intégration et expression du transgène.

1) Prémarquage des cellules au bisbenzimide Hoechst.

10 Voir I.

2) Préparation des cellules avant leur implantation.

Juste avant la procédure de greffe, les cellules sont rincées trois fois dans une solution de greffe 15 comprenant du PBS supplémenté en MgCl₂ et CaCl₂, à 1 µg/ml et en glucose à 0,1%, de manière à éliminer le milieu DMEM-SVF.

3) Chirurgie et implantation des cellules.

Des rats adultes mâles, appartenant à la souche Lewis et pesant 300 g, reçoivent une greffe de cellules RBEZ prémarquées, comme précisé en 1), sous anesthésie profonde, dans des conditions stéréotaxiques (cadre stéréotaxique Kopf®, atlas du cerveau de rat de Paxinos). Vingt animaux reçoivent respectivement une implantation 25 stéréotaxique, dans le noyau basal, de cellules RBEZ (hémisphère cérébral droit) et de cellules contrôles RBE4 (hémisphère cérébral gauche).

Un total de 300.000 cellules mises en suspension dans une solution de greffe (3 µl) est injecté par site à l'aide d'une micro seringue de 10 µl Exmire® ayant un diamètre externe d'aiguille de 0,5 mm.

4) Révélation histochimique X-gal pour la microscopie optique.

Les rats anesthésiés sont sacrifiés par perfusion avec 150 ml de PBS puis avec 300 ml de PFA à 4%, dans une solution de PBS (0,1 M, pH 7,4) à 4°C.

Pour la révélation de la présence de β -galactosidase, les cerveaux sont cryoprotégés et congelés par inclusion dans un composé OCT[®] une coupe au cryostat. Après coupe, l'activité enzymatique du transgène nls-lacZ est détectée par incubation à 37°C du tissu dans un tampon PBS contenant 2 mM de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactoside (X-gal, Sigma), du ferricyanure de potassium (20 mM), du ferrocyanure de potassium (20mM) et du MgCl₂ (2mM). Ces conditions de réaction n'entraînent pas de coloration chez les animaux contrôles et pour les cellules RBE4 non modifiées greffées (cellules greffées du côté gauche). La localisation cellulaire et la morphologie dans les coupes de tissu est augmentée si nécessaire à l'aide d'une optique Nomarski, qui permet une identification du type cellulaire fiable, dans la structure vasculaire. Cette révélation est associée si nécessaire avec une immunohistochimie EBA, pour une caractérisation cellulaire plus profonde.

La figure 6 illustre l'étude de l'intégration morphologique et fonctionnelle des cellules RBEZ par visualisation de l'expression du transgène nls-lacZ et du marqueur antigénique d'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (BHE), l'EBA (*endothelial barrier antigen*). Les figures 6A, 6B, 6C et 6D montrent des vaisseaux sanguins situés à distance de la zone de greffe, sur lesquels des cellules RBEZ ont migré après transplantation. Sur ces figures, des noyaux de cellules endothéliales, exprimant le transgène nls-lacZ, en position lumineuse (flèches) (6A, 6C), peuvent être observées. Ces mêmes vaisseaux, en lumière fluorescente (6B, 6D), expriment l'antigène EBA (têtes de flèches), indiquant ainsi que l'insertion vasculaire des cellules greffées n'a pas altéré l'intégrité de la BHE (x750 en 6A et 6B) ; (x1500 en 6C et 6D) ; (6A et 6C, en contraste interférentiel transmis). Le calcul du pourcentage de cellules greffées exprimant le transgène a été entrepris. Ainsi, à

une semaine post-greffe, $6,9 \pm 0,6\%$ des cellules Hoechst positives greffées exprime la β -galactosidase.

L'expression du transgène est importante jusqu'à 5 semaines après l'implantation, mais décroît 5 après. La présence de cellules implantées reste pourtant détectable à l'aide du colorant Hoechst précité. L'absence de changements majeurs spécifiques dans la réaction immunitaire de l'hôte vis-à-vis de la présence du transgène lacZ montre la bonne intégration de ces cellules RBEZ.
10

En outre, les cellules RBE4 et RBEZ ne développent jamais de tumeurs *in vivo*, car elles présentent une stabilité importante de leur phénotype.

5) Révélation histochimique X-gal pour la
15 microscopie électronique.

Des animaux ($n=10$) ont été traités pour une étude ultrastructurale de l'intégration des cellules RBEZ en microscopie électronique. Dans ce cas, les animaux ont été perfusés par une solution de PBS contenant 2,5% de 20 PFA et 0,5% de glutaraldéhyde. Les cerveaux sont prélevés et laissés dans le même fixateur pendant une nuit. Après rinçage, ils sont coupés au vibratome en sections d'épaisseur 75 μm .

Pour la visualisation des cellules exprimant 25 le gène lacZ, le substrat X-Gal a été utilisé comme pour la microscopie optique, qui, sous l'action de la β -galactosidase, forme un précipité dense aux électrons, visible au microscope électronique.

Un pré-repérage du greffon est effectué sur 30 coupe avant traitement au OsO₄ à 1%. Ces coupes épaisses sont ensuite déshydratées, puis incluses dans l'épon.

Les blocs de tissus sont ensuite sectionnés avec un ultramicrotome en coupes semi-fines et ultra-fines qui sont contre-colorées ou non à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb, puis examinées sur un appareil JEOL CX100.
35

La figure 7 illustre l'étude de l'intégration morphologique et fonctionnelle des cellules RBEZ par visualisation de l'expression du transgène nls-lacZ en microscopie électronique. La figure 7A montre, en optique Nomarski, le marquage β -galactosidase péri-nucléaire dans les cellules greffées sur une coupe semi-fine de cerveau (2 μm) ($\times 1660$). A l'examen en microscopie électronique, les cellules sont observées soit dans le parenchyme (figure 7B), soit en position vasculaire (figure 7C), formant des vaisseaux sanguins de l'hôte. Les têtes de flèche pointent sur les précipités X-gal péri-nucléaires, denses aux électrons. Même intégrées dans le parenchyme cérébral, en absence de contacts directs avec le compartiment sanguin, ces cellules endothéliales cérébrales sont capables de survivre pendant de longues périodes. Les cellules greffées apparaissent métaboliquement actives et capables d'établir des connections spécialisées entre elles et avec les cellules de l'hôte (présence de desmosomes et de jonctions serrées). En position vasculaire, les cellules RBEZ présentent un phénotype normal, dès la première semaine post-greffe (jonction serrée et peu de vésicules de pinocytose) ($\times 160\,000$ en 7B et 7C) (L : lumière vasculaire).

III. Cellules RBEZ et tumeurs cérébrales :

1) Implantation :

Les cellules RBEZ à confluence sont trypsiniées et remises en suspension dans du DMEM sans sérum, immédiatement avant leur implantation dans les animaux hôtes.

- Pour une implantation intracrânienne, les cellules RBEZ (5.10^5 cellules) sont injectées stéréotaxiquement avec une seringue (Hamilton, gauge 26, en biseau), au niveau du noyau caudé et du putamen de rats Fischer 344 (200 à 250 g), après anesthésie.

Les cellules sont injectées dans un volume de 5 μl et l'aiguille est laissée en place 2 min après l'injection pour limiter les fuites.

- Dans le cadre d'une implantation sous-cutanée, les rats Fischer anesthésiés reçoivent 100 µl contenant 10^6 cellules RBEZ.

Pour montrer que de telles cellules s'implantent de préférence dans des régions hypervascularisées telles que des tumeurs, un essai est réalisé en faisant les mêmes implantations (intracrânienne et sous-cutanée) avec un mélange de cellules de gliomes 9L, F98 ou C6 (10^5 cellules) et de cellules RBEZ, dans les mêmes conditions que ci-dessus.

Après implantation, les tissus sont préparés de manière à faire une étude immunohistochimique et histologique.

2) Préparation des tissus :

Les rats sont anesthésiés avec de l'éther et après une thoracotomie, l'oreille droite est incisée et une canule est insérée dans le ventricule gauche qui est alors perfusé séquentiellement avec un tampon contenant NaCl 120 mM, KCl 2,7 mM dans un tampon phosphate pH 7,4 (1 ml/g de poids) puis du paraformaldéhyde à 3,7% (fixateur). Les cerveaux sont placés dans le même fixateur, pendant 30 minutes, cryoprotégés avec du saccharose à 30% dans du PBS et congelés. Les tissus sont coupés (12 µm d'épaisseur) et montés sur lames gélatinées.

25 3) Mise en évidence de la survie des cellules et de l'expression du transgène

a) Protocole histochimique et immunohistochimique pour la détection des cellules RBEZ exprimant le gène reporter nls-lacZ :

30 * Etude histochimique

Les préparations sur lames sont rincées trois fois dans un tampon PBS, puis incubées à 37°C pendant 1 à 2 heures dans du PBS contenant 0,5 mg/ml de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-gal), du ferri-cyanure de potassium 20 mM, du ferrocyanure de potassium 20 mM et du MgCl₂, 2 mM. Les coupes incubées en l'absence de substrat X-gal sont utilisées comme contrôle négatif.

Les coupes sont ensuite rincées dans un tampon PBS et montées en glycérol à 90% dans du PBS, contenant de l'azoture de sodium à 0,02%.

Les conditions de réaction n'entraînent aucune coloration chez les animaux-contrôle qui n'ont reçu aucune cellule RBEZ.

* Etude immunohistochimique

Quelques coupes présentent une réaction positive à la laminine dans la tumeur (déttection des micro-vaisseaux tumoraux), à l'antigène de prolifération nucléaire Ki67 et à l'expression de marqueurs de la barrière hématoencéphalique, tel que le transporteur de glucose endothérial de type I (glut-1), après coloration avec le X-gal. Pour la coloration à la laminine, les coupes sont digérées pendant 15 minutes à 37°C avec de la pepsine 0,2% dans de l'HCl 0,01 N avant l'incubation avec les réactifs immunologiques.

Les coupes sont séquentiellement incubées avec du sérum de chèvre normal à 1%, puis soit avec des anticorps de lapin anti-laminine, des anticorps de lapin anti-glut1 ou des anticorps de lapin anti-Ki67, puis de l'immunoglobuline biotinylée de chèvre anti-lapin est ajoutée (1:200 dans du PBS).

Les coupes sont alors incubées avec un complexe avidine-biotine-peroxydase (1:50 dans du PBS), suivi d'une incubation dans un tampon Tris 50 mM contenant 0,5 mg/ml de 3-3'-diaminobenzidine (Sigma) et 0,01 % de peroxyde d'hydrogène.

Les lames-contrôle sont incubées avec du sérum de lapin normal à la place du sérum immun. Les sections sont montées en glycérol à 90% dans du PBS.

b) Résultats

1) Visualisation des cellules RBEZ implantées

Après coloration avec le substrat chromogénique X-Gal, le produit bleu de la réaction avec le β -galactosidase est identifié dans des coupes histologiques des tumeurs intracrâniennes et sous-cutanées après greffe de cellules tumorales et RBEZ (tableaux I et II).

Aucun produit de réaction bleu n'est détecté dans les tumeurs implantées sans cellule RBEZ. De manière surprenante, les cellules endothéliales greffées sont distribuées à travers toutes les tumeurs intracrâniennes, 5 y compris les infiltrations marginales, mais n'apparaissent pas migrer dans les tissus normaux.

2) Intégration des cellules RBEZ implantées

Essentiellement toutes les cellules β -galactosidase positives, quelle que soit leur localisation, se 10 colorent avec les anticorps antilaminine, ceci étant en accord avec leur phénotype endothérial. De manière intéressante, quelques cellules RBEZ greffées sont associées avec des profils micro-vasculaires tumoraux.

La figure 8 illustre l'intégration de cellules 15 RBEZ dans le tissu tumoral (cellules C6) et son réseau vasculaire (tête de flèche) sur une coupe de tissu cérébral contre-colorée au rouge neutre et en optique Nomarski.

Ceci suggère que les cellules RBEZ implantées 20 de cette façon ont la capacité de s'intégrer d'une manière anatomiquement correcte dans la vascularisation tumorale.

3) Fonctionnalités des cellules RBEZ intégrées.

Une des caractéristiques les plus importantes 25 de ces cellules endothéliales cérébrales est leur expression élevée du transporteur de type 1 du glucose (Glut-1), exprimé au niveau de la barrière hémato-encéphalique. Ceci est important pour le transport trans-endothéliale 30 du D-glucose, le substrat énergétique essentiel du cerveau. Les cellules endothéliales dans les gliomes intracrâniens 9L ou autres expriment également ce transporteur. Par contre, l'expression du Glut-1 diminue rapidement dans les cellules endothéliales cérébrales en culture. 35

De nombreuses cellules β -gal positives sont marquées avec les anticorps anti-Glut-1. Ces différents

essais montrent que des cellules endothéliales cérébrales génétiquement modifiées *ex vivo* survivent, s'intègrent dans les gliomes intracrâniens et expriment le transgène.

4) Prolifération des cellules RBEZ implantées
5 L'expression de l'antigène Ki67 de prolifération par les cellules RBEZ implantées dans les tumeurs 9L intracrâniennes est examinée.

De nombreuses cellules exprimant à la fois le β -galactosidase nucléaire et l'antigène Ki67 sont observées.
10

Le nombre de cellules RBEZ implantées par section tumorale est quantifié par analyse d'images assistée par ordinateur en utilisant le dispositif d'imagerie (MCID) fourni par la Société Imagine Research Inc.
15 (Brock, University St Catherines, Ontario, Canada), une caméra CCD à haute résolution Hamamatsu et un ordinateur Compaq DeskPro 486/33.

Le nombre total de cellules RBEZ par tumeur est estimé à partir du nombre de cellules RBEZ par volume tumoral (coupe adjacente de 12 μm) et le volume tumoral total est estimé à partir des limites de la tumeur, selon deux plans de coupe orthogonaux.
20

Les Tableaux I et II illustrent les résultats obtenus lors de l'implantation des cellules endothéliales 25 cérébrales modifiées, conformément à l'invention, dans des gliomes 9L.

TABLEAU I

Nombre de tumeurs examinées	Nombre de tumeurs β -Gal +	Nombre de jours après implantation des cellules RBEZ
4	4	7
10	10	12
4	4	14
3	3	21
3	3	28
4	4	35

TABLEAU II

	Type de tumeur (jours)	Nombre de cellules RBEZ/Tumeur (moyenne \pm SEM)
Intracrânien	9L (J12)	166 440 \pm 19 550
	C6 (J12)	145 840 \pm 42 160
	F98 (J12)	232 560 \pm 69 070
Sous-cutané	9L (J14)	494 560 \pm 422 500
	9L (J21)	5 252 160 \pm 611 380

5) Identification du gène nls-lacZ dans les
5 tumeurs implantées avec des cellules RBEZ, par PCR.

Des oligonucléotides complémentaires de séquences d'ADN, localisées sur le gène nls-lacZ (5'-CGACTCCTGGAGGCCGTCAGTATC-3') et sur le vecteur, en aval de la séquence 3'LTR (5'-GACCACTGATATCCTGTCTTAAC-3'), 10 sont utilisés comme amorces. La PCR est réalisée sur de l'ADN génomique isolé de tumeurs contrôles (tumeur 9L ; figure 9, lignes 2 et 3), de tumeurs expérimentales (tumeurs ayant intégré des cellules RBEZ : implantation 14 jours avant l'isolement de l'ADN ; figure 9, lignes 4-15 6) et des lignées cellulaires RBEZ (figure 9, ligne 7) et RBE4 (figure 9, ligne 8). 35 cycles d'amplification avec de la Taq polymérase sont réalisées dans les conditions suivantes : dénaturation à 95°C, hybridation à 60°C et élongation à 72°C.

20 La figure 9 montre les résultats obtenus : le produit de la PCR (400pb) n'est présent que dans les échantillons contenant les cellules RBEZ.

IV. Cellules RBE/NGF :

25 1) Prémarquage au bisbenzimide Hoechst, voir I.

2) Implantation :

Juste avant la procédure de greffe, les cellules sont rincées trois fois dans une solution de greffe comprenant du PBS supplémenté avec MgCl₂ et CaCl₂, à 1 30 µg/ml et avec du glucose à 0,1%, de manière à éliminer le milieu DMEM-SVF.

Chirurgie et implantation des cellules :

Un total de 50 rats mâles adultes, répartis en 2 groupes, appartenant à la souche Lewis, pesant environ 300 g reçoivent une greffe de cellules RBE/NGF prémarquées au colorant Hoechst, sous anesthésie profonde dans des conditions stéréotaxiques.

Dix animaux reçoivent une implantation stéréotaxique de cellules RBE/NGF dans le noyau basal droit. Un autre groupe (n = 40) est soumis à une procédure 10 d'injections en sites multiples de cellules RBE/NGF (côté droit), de manière à réaliser une colonne cellulaire de 2 mm de hauteur entre le noyau basal et le striatum dorsal. Un total de 300.000 cellules, mises en suspension dans une solution de greffe (3 µl), est injecté par site à 15 l'aide d'une micro-seringue de 10 µl Exmire® avec un diamètre d'aiguille externe de 0,5 mm.

Comme procédure de contrôle, des cellules RBE4 non modifiées et marquées au colorant Hoechst sont également greffées en même temps, de manière contralatérale 20 (côté gauche) et en utilisant les mêmes niveaux stéréotaxiques. Des coupes coronales et horizontales des cerveaux greffés sont collectées, entre 1 semaine et 12 mois après la transplantation. Les greffes examinées, visualisées par la fluorescence obtenue à l'aide du colorant Hoechst montrent un aspect compact avec un étalement cellulaire faible. Aucune tumorisation des cellules 25 greffées RBE/NGF n'a été observée.

3) Préparation des tissus pour l'immunohistochimie:

30 1 semaine, 3 semaines, 5 semaines, 8 semaines et 1 an après implantation, les animaux sont anesthésiés et perfusés en intracardiaque, avec une solution de PBS 0,1 M, pH 7,4 à 4°C, suivi par une perfusion de paraformaldehyde à 4% dans le même tampon. Les cervaux 35 sont retirés et stockés dans le même tampon pendant une nuit à 4°C. Les cerveaux sont alors stockés dans un tampon PBS comprenant du saccharose à 30% pendant 2 jours

à 4°C et congelés dans de l'isopentane à -60°C. Les coupes coronales et horizontales (30 µm d'épaisseur) sont réalisées à l'aide d'un cryostat et collectées dans des puits remplis de PBS à 4°C. Les coupes sont divisées en 5 différents groupes, pour réaliser une analyse immunohistochimique, ainsi qu'une coloration au bleu de toluidine.

Pour l'analyse immunohistochimique, les coupes sont initialement traitées avec du PBS contenant du H₂O₂ 10 0,4 %, pendant 30 minutes, et rincées dans le même tampon. Elles sont alors incubées dans un sérum normal à 10%, du même animal que celui utilisé pour produire les anticorps secondaires et du Triton X-100 0,1% dans du PBS pendant 1 heure, puis avec l'un des anticorps primaires 15 suivant :

- Anticorps primaire polyclonal :

anticorps de lapin anti-Glut-1 (transporteur de glucose spécifique du cerveau), (1:5000, Biogenesis) ; anticorps de lapin anti-GFAP (1:6000, Dako) ; anticorps de 20 chèvre anti-ChAT (1:100, Chemicon) ; anticorps de lapin anti-laminine (1:5000, Sigma).

- Anticorps primaire monoclonal :

anticorps de souris anti-p75 LNGFR (Low affinity NGF receptor) (1:150, clone 192, Boehringer) ; anticorps de souris anti-CD11b (macrophages de rat) 25 (1:1000, clone MRC OX-42, Serotec) ; anticorps de souris anti-lymphocytes T de rat (1:2000, clone MRC OX-52, Serotec) ; anticorps de souris anti-complexe majeur d'histocompatibilité I de rat (1:1000, clone MRC OX-18, Serotec) ; anticorps de souris anti-CMH classe II (Ia) de 30 rat (1:1000, clone MRC OX-6, Serotec) ; anticorps de souris anti-EBA (antigène de barrière hémato-encéphalique, spécifique du rat) (1:1000, clone SMI71, Affiniti).

Tous les anticorps sont dilués dans un tampon 35 PBS contenant 5% de sérum normal (sérum d'âne pour les anticorps polyclonaux, et sérum de mouton pour les anticorps monoclonaux) et du Triton X-100 à 0,1% et incubés pendant 36 heures sous agitation à 4°C. Les coupes sont

rincées et incubées avec des anticorps biotinylés d'âne anti-IgG de lapin (1:2000, Amersham), anti-IgG de chèvre (1:1000, Jackson Laboratories) ou des anticorps biotinylés de mouton anti-IgG de souris (1:600, Amersham) dans un tampon PBS contenant 5% de sérum normal et 0,1% de Triton X-100, pendant une nuit sous agitation à 4°C. Elles sont rincées, puis incubées avec un complexe biotine-avidine-peroxydase (Vector Laboratories) pendant 30 minutes et rincées à nouveau avec un tampon Tris (TBS 0,1 M, pH 7,6). Les coupes sont alors incubées dans une solution de tétrahydrochlorure de diaminobenzidine, avec du chlorure de nickel et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dans le tampon TBS (0,05 M, pH 7,3). La réaction enzymatique est arrêtée par lavage des coupes dans le tampon. Lesdites coupes sont ensuite contre-colorées et déshydratées, montées sur lames et observées au microscope. Un contrôle est systématiquement réalisé en omettant les anticorps primaires et dans ces conditions, les coupes sont toujours non-marquées.

4) Préparation des tissus et détection par hybridation *in situ* du transgène NGF.

La détection cellulaire des transcrits β NGF *in vivo* est mise en évidence par hybridation *in situ* du NGF (ARNm) dans le greffon, une semaine après l'implantation dans le cerveau de rat adulte, ainsi qu'à 3 et 8 semaines, dans les conditions suivantes :

Après anesthésie profonde avec de la kétamine (150 mg.kg⁻¹, Imalgene) les rats sont perfusés avec du paraformaldéhyde à 2% dans du tampon PBS 0,1 M (pH 7,4, 4°C). Les cerveaux prélevés sont placés dans ce tampon pendant 60 minutes à 4°C. Après une cryoprotection pendant une nuit dans une solution de saccharose à 15% dans du PBS 0,1 M à 4°C, une congélation rapide des échantillons est réalisée par immersion dans de l'isopentane à -60°C. Les cerveaux congelés sont coupés horizontalement (10-14 μ m), à l'aide d'un cryostat Microm, puis montés sur des lames gélatinées et séchées à température ambiante. Les coupes sont pré-hybridées pendant une heure

à 40°C dans un tampon 4XSSC, 1X Denhardt. L'hybridation est réalisée en chambre humide à 37°C pendant 16 heures, en utilisant comme tampon d'hybridation un mélange 4XSSC, formamide à 50%, sulfate de dextran à 10%, 1X Denhardt, 5 500 µg/ml d'ADN fragmenté et dénaturé de sperme de saumon et 100 µg/ml d'ARNt de levure, contenant la sonde NGF précitée à une concentration finale de 2 µg/ml. Les lames sont lavées séquentiellement dans du 2XSSC pendant une heure à 20°C, puis dans du 1XSSC pendant une heure à 10 20°C, puis dans du 1XSSC pendant une demi-heure à 37°C et dans du 0,5XSSC pendant une demi-heure à 20°C. La sonde hybridée, marquée à la digoxigénine, est détectée en utilisant un kit de détection immunoenzymatique (Boehringer-Mannheim), selon les instructions du fabricant. Des procédures de contrôle sont réalisées parallèlement, soit par digestion des ARNm avec de la RNase A (20 µg/ml pendant 30 minutes à 37°C), soit par compétition avec un excès de sonde non marquée, (excès de l'ordre de 40) dans le mélange d'hybridation. Une dilution de 15 la sonde à 0,5 µg/ml donne un signal faible mais spécifique. L'absence de signal est observée lorsque l'on ne met pas la sonde NGF pendant l'hybridation.

Dans ce cas, une présence importante de transcrits NGF est détectée dans les greffons RBE/NGF, reflétant une expression constitutive contrôlée par le LTR de ce transgène.

La figure 10 illustre l'étude *in vivo* de l'expression du transgène NGF dans les cellules RBE/NGF, trois semaines après transplantation dans le *nucleus basalis* (noyau basal) et la figure 11 illustre les structures cérébrales témoins utilisées comme contrôle interne de l'hybridation *in situ* du messager NGF, *in vivo*.

Les figures 10A et 10B montrent un greffon (G) de cellules RBE/NGF exprimant fortement le transgène NGF détecté par hybridation *in situ*. Cette expression du transgène reste toujours aussi forte 3 semaines après la greffe intra-cérébrale. La figure 10C visualise un greffon témoin (G) de cellules RBE4 non infectées, greffé

dans l'hémisphère controlatéral, qui ne présente aucun signal NGF positif ($\times 130$ en 10A) ; ($\times 270$ en 10B et 10C, avec contraste interférentiel transmis). La figure 11A illustre la détection neuronale de NGF, au niveau du cortex fronto-pariéital et la figure 11B illustre la détection de NGF au niveau de l'hippocampe ($\times 260$ en 11A) ; ($\times 65$ en 11B). Ces figures sont en accord avec la description établie de la synthèse endogène de NGF par les neurones du cortex cérébral et de l'hippocampe chez le rat adulte.

5) effet biologique du NGF produit par le greffon, sur les neurones cholinergiques du noyau basal (effet de bourgeonnement axonal)

Pour explorer l'effet biologique du produit du transgène NGF sécrété *in vivo*, le test fonctionnel suivant est réalisé : la lignée cellulaire modifiée est greffée comme précisé ci-dessus dans le noyau basal, dans lequel les neurones cholinergiques présentent une réponse très sensible au NGF. Ces neurones cholinergiques, outre leur expression de l'enzyme ChAT, peuvent également être caractérisés par une immunoréactivité importante au récepteur p75LNGFR. Ce dernier permet de visualiser les fibres cholinergiques ainsi que leurs somas cellulaires, spécialement lors des études de régénération axonale. Le 10 bourgeonnement réactionnel détecté par immunoréactivité p75LNGFR est observé au moins jusqu'à trois semaines, au niveau des greffons RBE/NGF.

Dans le premier groupe greffé, l'effet biologique du NGF produit par les greffons sur les neurones cholinergiques du noyau basal (bourgeonnement axonal) est localisé dans cette région et n'excède pas les limites de cette dernière.

La figure 12 illustre l'effet biologique du NGF sécrété par les cellules RBE/NGF, trois semaines après la greffe, au niveau du nucleus basalis (NB) (action sur la promotion et le maintien de la repousse axonale réactive des neurones cholinergiques lésés après la transplantation). En 12A, une vue générale de la forme

d'un greffon RBE/NGF, placé dans le NB, est visualisée, à l'aide du prémarquage Hoechst. En 12B, 12D et 12F, l'effet du NGF produit par les cellules endothéliales sur la repousse axonale est visualisé par la forte immunoréactivité de ces processus axonaux pour le récepteur p75 du NGF. Cette repousse axonale a lieu tout le long du greffon (G) et présente une forte réactivité autour de certains vaisseaux sanguins (flèches).

En 12C et 12E, 3 semaines après la greffe, des greffons RBE4 témoins non-infectés avec la construction rétrovirale NGF, placés dans le NB de l'hémisphère contralatéral, sont incapables de promouvoir et de maintenir une repousse axonale réactive des neurones cholinergiques du NB (x65 en A, B, C, D, E et F, plan horizontal).

Cependant, dans le second groupe, le bourgeonnement dû au NGF sécrété par les cellules greffées est plus étendu dans l'axe ventro-dorsal, le long de la greffe, liant le noyau basal au striatum dorsal, montrant ainsi les effets trophiques et tropiques du NGF. La figure 13 illustre l'effet biologique du NGF sécrété par les cellules RBE/NGF, trois semaines après la greffe, à distance du *nucleus basalis* et illustre la croissance directionnelle des prolongements en croissance des neurones cholinergiques du NB, le long du greffon jusqu'au niveau du striatum dorsal. Les figures 13A et 13B illustrent une coupe horizontale passant par la partie dorsale du greffon dans le striatum. En 13A, les cellules RBE/NGF sont visualisées par le colorant nucléaire Hoechst. En 13B, la même coupe a été réalisée en lumière transmise, montrant une repousse axonale réactive visualisée par l'anticorps anti-p75 NGF récepteur (x100 en 13A et 13B).

Une quantification de l'effet biologique induit par l'expression du transgène NGF, a été entreprise selon la méthode décrite par Gundersen H.J.G. et al. (APMIS, 1988, 96, 379-394), en calculant la surface occupé par l'immunomarquage p75LNGFR au niveau des sites d'implantation des cellules RBE/NGF et RBE4. Le rapport de cette surface et de celle occupée par le greffon a été

calculée à 3 et 8 semaines post-implantation et présenté dans la figure 14 où la surface occupée par les structures p75LNGFR positives (exprimée en pourcentage par rapport à celle du greffon) est portée en ordonnée.

5 Parmis les différents clones testés *in vivo*, seuls les deux plus producteurs de NGF *in vitro* (clones RBE/NGF-2 et -4, précités) ont entraîné un effet biologique *in vivo*, comme résumé dans le Tableau III ci-dessous:

TABLEAU III

clones		Délais post-greffe			
		1 semaine	3 semaines	8 semaines	12 mois
NGF4	effet biologique	0/5	5/5	1/5	0/2
	NGF mRNA	2/2	2/2	0/2	
	Hoechst+/n	5/5	5/5	5/5	2/2
NGF4	effet (Thalamus) biologique		0/4		
NGF2	effet biologique	0/5	4/5	0/5	0/5
	NGF mRNA	2/2	2/2	0/2	
	Hoechst+/n	5/5	5/5	5/5	3/3

10

- effet biologique: nombre de cerveaux où une croissance neuritique a été observée autour du greffon RBE/NGF par rapport au nombre total de cerveaux greffés.
- NGF mRNA: nombre de cerveaux où les transcripts du NGF ont pu être détectés par hybridation *in situ* par rapport au nombre total de cerveaux traités.
- Hoechst+/n: nombre d'animaux où des cellules endothéliales prémarquées au Hoechst ont été détectées par rapport au nombre total d'animaux traités.

15

20 6) Tolérance immunologique.

Pour pouvoir étudier la réaction immunologique de l'hôte vis-à-vis des lignées de cellules endothéliales

greffées, des marquages immunohistochimiques ont été réalisées, utilisant des marqueurs de macrophages, du complexe majeur d'histocompatibilité et des lymphocytes.

A une semaine, on observe une infiltration de 5 macrophages au niveau du site de transplantation, avec une diminution de leur présence avec le temps.

Cette infiltration est liée au traumatisme chirurgical dû à la transplantation.

Cependant, aucune infiltration par des lymphocytes n'est observée, même un mois après la transplantation.

Ces données suggèrent que de telles greffes sont bien tolérées par l'hôte, qui ne développe pas de réaction de rejet aiguë vis-à-vis des différentes lignées 15 de cellules endothéliales greffées.

Les données ci-dessus montrent qu'aussi bien les cellules RBE4 seules que les cellules RBEZ et les cellules RBE/NGF, survivent et s'intègrent après greffes. Les cellules RBEZ et RBE/NGF sont capables d'exprimer 20 et/ou de sécréter le produit dudit transgène qui, dans le cas du NGF, a la capacité d'induire un effet biologique dans le cerveau.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de 25 mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écartier du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

MICRO-ORGANISMES

Feuille technique relative au micro-organisme mentionné en page - 5 ---- ligne 7 de la description :

A. IDENTIFICATION DU DÉPÔT :

D'autres détails sont donnés sur une feuille supplémentaire

Nom de l'institution de dépôt :

Collection Nationale de Cultures de Microorganismes

Adresse de l'institution de dépôt (y compris le code postal et le pays) :

28 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS CEDEX 15

Date du dépôt :

10 octobre 1994

N° d'ordre :

I-1481

B. INDICATIONS SUPPLEMENTAIRES : (à ne remplir que si nécessaire). Une feuille séparée est jointe pour la suite de ces renseignements

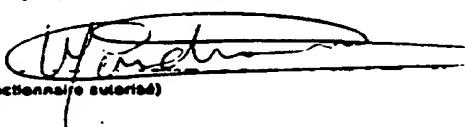
"En ce qui concerne les désignations dans lesquelles un brevet européen est demandé, un échantillon du micro-organisme déposé ne sera accessible, jusqu'à la publication de la mention de la délivrance du brevet européen ou jusqu'à la date à laquelle la demande sera rejetée, retirée ou réputée retirée, que par la remise d'un échantillon à un expert désigné par le requérant. (règle 28.4) de la CBE)".

C. ÉTATS DÉSIGNÉS POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNÉES : (si les indications ne sont pas données pour tous les Etats désignés)

D. INDICATIONS FOURNIES SÉPARÉMENT : (à ne remplir que si nécessaire)

Les indications énumérées ci-après seront communiquées ultérieurement au Bureau international ? (spécifier la nature générale des indications p. ex., « N° d'ordre du dépôt »)

E. La présente feuille a été reçue avec la demande internationale lorsque celle-ci a été déposée (à vérifier par l'office récepteur)


(Fonctionnaire autorisé)

Date de réception (en provenance du déposant) par le Bureau international :

(Fonctionnaire autorisé)

(Janvier 1995)

No de la demande internationale: PC1.

MICRO-ORGANISMES

Feuille facultative relative au micro-organisme mentionné en page ... 5 ... ligne. 19
de la description.

A. IDENTIFICATION DU DÉP. T¹

D'autres détails sont identifiés sur une feuille supplémentaire:

Nom de l'institution de dépôt:

Collection Nationale de Cultures de Microorganismes

Adresse de l'institution de dépôt (y compris le code postal et le pays):

28 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS CEDEX 15

Date du dépôt:

10 octobre 1994

N° d'ordre:

I-1482

B. INDICATIONS SUPPLÉMENTAIRES (à ne remplir que si nécessaire). Une feuille séparée est jointe pour la suite de ces renseignements:

"En ce qui concerne les désignations dans lesquelles un brevet européen est demandé, un échantillon du micro-organisme déposé ne sera accessible, jusqu'à la publication de la mention de la délivrance du brevet européen ou jusqu'à la date à laquelle la demande sera rejetée, retirée ou réputée retirée, que par la remise d'un échantillon à un expert désigné par le requérant. (règle 28.4) de la CBE)".

C. ÉTATS DÉSIGNÉS POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNÉES (si les indications ne sont pas données pour tous les Etats désignés)

D. INDICATIONS FOURNIES SÉPARÉMENT (à ne remplir que si nécessaire)

Les indications énumérées ci-après seront soumises ultérieurement au Bureau International: (spécifier la nature générale des indications p. ex., N° d'ordre du dépôt)

E. La présente feuille a été reçue avec la demande internationale lorsque celle-ci a été déposée (à vérifier par l'office receveur)

(Fonctionnaire autorisé)

Date de réception (en provenance du déposant) par le Bureau International: 10

(Fonctionnaire autorisé)

(Janvier 1995)

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: NEUROTECH SA
(B) RUE: 69 rue de Lourmel
(C) VILLE: PARIS
(E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 75015
- (A) NOM: CHAVEROT Nathalie
(B) RUE: 10 rue Jeanne d'Arc
(C) VILLE: Paris
(E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 75013
- (A) NOM: COURAUD Pierre-Olivier
(B) RUE: 9 rue du Perray
(C) VILLE: AUFFARGIS
(E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 78610
- (A) NOM: LATERRA John
(B) RUE: 608 Hastings Road
(C) VILLE: BALTIMORE
(D) ETAT OU PROVINCE: MARYLAND
(E) PAYS: U.S.A.
(F) CODE POSTAL: 21286
- (A) NOM: QUINONERO Jerome
(B) RUE: 5 cours du Lazard
(C) VILLE: NOISIEL
(E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 77186
- (A) NOM: ROUX Francoise
(B) RUE: 27 avenue d'Italie
(C) VILLE: PARIS
(E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 75013
- (A) NOM: STROSBERG Arthur Donny
(B) RUE: 66 rue de Javel
(C) VILLE: PARIS
(E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 75015
- (A) NOM: TCHELINGERIAN Jean-Leon
(B) RUE: 44 rue de la Butte aux Cailles
(C) VILLE: PARIS
(E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 75013
- (A) NOM: VIGNAIS Lionel
(B) RUE: 14 rue Domremy
(C) VILLE: PARIS
(E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 75013

(ii) TITRE DE L' INVENTION: LIGNEES IMMORTALISEES DE CELLULES
ENDOTHELIALES CEREBRALES ET LEURS APPLICATIONS AU
TRAITEMENT DE DIFFERENTS TROUBLES OU MALADIES PRIMAIRES ET
SECONDAIRES, NEUROLOGIQUES OU PSYCHIATRIQUES.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 3

- (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:
- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
 - (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
 - (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 48 paires de bases
 - (B) TYPE: nucl,otide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

CTGCTTCTCA TCTGTTGTCA ACGCCTTGAC GAAGGTGTGA GTCGTGGT

48

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
 - (B) TYPE: nucl,otide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (g,nomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

CGACTCCTGG AGCCCGTCAG TATC

24

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
 - (B) TYPE: nucl,otide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: lin,aire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (g,nomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

GACCACTGAT ATCCTGTCTT TAAC

24

REVENDICATIONS

1°) Lignées de cellules endothéliales de mammifères, caractérisées :

. en ce qu'elles sont constituées par des cellules endothéliales cérébrales immortalisées, présentant au moins l'une des caractéristiques suivantes des cellules endothéliales cérébrales différencierées, de manière stable :

- l'expression de marqueurs endothéliaux,
- la sécrétion de substances vasoactives,
- 10 - l'expression de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH),

- l'expression de récepteurs hormonaux, et
- l'existence de jonctions serrées,

. en ce qu'elles comprennent un fragment d'acide nucléique comprenant au moins un fragment immortalisant d'un oncogène viral ou cellulaire, éventuellement associé à au moins un gène de sélection, et un vecteur d'expression comprenant une séquence codant pour un polypeptide, une protéine ou un vecteur viral, éventuellement associé à au moins un gène de sélection et éventuellement au moins un gène marqueur et

. en ce qu'elles sont capables *in vivo* de s'intégrer aux vaisseaux cérébraux d'un mammifère hôte et de produire ledit polypeptide, ladite protéine ou ledit vecteur viral.

2°) Lignées de cellules endothéliales selon la revendication 1, caractérisées en ce que le fragment d'acide nucléique comprenant au moins un fragment immortalisant d'un oncogène contient le gène de la résistance à la néomycine et un fragment de l'oncogène T de SV40.

3°) Lignées de cellules endothéliales selon la revendication 1, caractérisées en ce que le fragment d'acide nucléique comprenant au moins un fragment immortalisant d'un oncogène contient la région précoce E1A du génome de l'adénovirus 2 et le gène de résistance à la néomycine.

4°) Lignées de cellules endothéliales selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisées en

ce que ledit vecteur d'expression est un vecteur rétroviral, notamment un vecteur MFG.

5°) Lignées de cellules endothéliales selon la revendications 4, caractérisées en ce que le vecteur rétroviral est un vecteur MFG-NB.

6°) Lignées de cellules endothéliales selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisées en ce que la séquence codant pour un polypeptide ou une protéine est sélectionnée parmi les séquences codant pour : 10 des enzymes, des inhibiteurs d'enzymes, des cytokines, des neurotrophines, des neurotransmetteurs, des facteurs de croissance, des toxines, des antimétabolites, des neurohormones, des gangliosides, des antibiotiques, des facteurs thrombolytiques, des facteurs coagulants, des facteurs 15 vasodilatateurs ou vasoconstricteurs, des facteurs hypo- ou hypercholestérolémiants, des facteurs hyper- ou hypoglycémiants.

7°) Lignées de cellules endothéliales selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisées en 20 ce qu'elles sont constituées de cellules endothéliales de capillaires cérébraux.

8°) Lignées de cellules endothéliales selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisées en ce qu'elles comprennent avantageusement, en tant que fragment immortalisant, la région précoce E1A du génome de l'adénovirus 2 et le gène de résistance à la néomycine et en tant que vecteur d'expression, un vecteur rétroviral MFG-NB contenant le gène nls-lacZ codant pour la β -galactosidase.

30 9°) Lignée de cellules endothéliales selon la revendications 8, caractérisée en ce qu'elle a été déposée sous le n° I-1481 en date du 10 octobre 1994 auprès de la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes tenue par l'Institut Pasteur.

35 10°) Lignée de cellules endothéliales selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce qu'elles comprennent avantageusement, en tant que fragment immortalisant, la région précoce E1A du génome de

l'adénovirus 2 et le gène de résistance à la néomycine et en tant que vecteur d'expression, un vecteur rétroviral pMMuLVisisNGF codant pour le β NGF murin.

11°) Lignée de cellules endothéliales selon la 5 revendication 10, caractérisée en ce qu'elle a été déposée sous le n° I-1482 en date du 10 octobre 1994 auprès de la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes tenue par l'Institut Pasteur.

12°) Compositions, caractérisées en ce qu'elles 10 comprennent au moins une lignée de cellules endothéliales cérébrales selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, associée à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

13°) Compositions selon la revendication 12, 15 caractérisées en ce qu'elles contiennent de préférence entre 10^4 et 10^5 cellules endothéliales/ μ l.

14°) Procédé d'obtention d'une lignée cellulaire modifiée selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, lequel procédé est caractérisé en ce que:

20 (1) on réalise une première transfection par :
- culture de cellules endothéliales cérébrales, de préférence de microvaisseaux cérébraux dans un milieu de culture convenable, supplémenté en sérum et en facteurs de croissance,

25 - transfection desdites cellules entre le 2ème et le 6ème passage avec un fragment d'acide nucléique comprenant au moins un fragment immortalisant d'un oncogène viral ou cellulaire et éventuellement au moins un gène de sélection, notamment un gène codant pour la résistance à un 30 antibiotique,

- sélection des cellules transfectées sur un milieu de sélection adapté audit gène de sélection, si nécessaire,

35 (2) puis on réalise une transfection des cellules obtenues en (1) avec un vecteur d'expression contenant la séquence de polypeptide ou de protéine à produire ou un vecteur viral à exprimer.

15°) Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que la transfection de l'étape (2) est réalisée avec un vecteur rétroviral, de préférence un vecteur MFG dans lequel la séquence codant pour la protéine à exprimer a été préalablement incorporée.

16°) Utilisation des lignées de cellules endothéliales de mammifères, constituées par des cellules endothéliales cérébrales immortalisées, comprenant un fragment d'acide nucléique incluant au moins un fragment immortalisant d'un oncogène viral ou cellulaire, éventuellement associé à au moins un gène de sélection, et éventuellement un vecteur d'expression comprenant une séquence codant pour un polypeptide, une protéine ou un vecteur viral, éventuellement associé à au moins un gène de sélection et éventuellement au moins un gène marqueur, pour l'obtention d'un médicament pour le traitement des troubles ou maladies primaires et secondaires neurologiques ou psychiatriques, y compris les tumeurs cérébrales.

17°) Utilisation selon la revendication 16, caractérisée en ce que ladite lignée de cellules endothéliales est la lignée de cellules endothéliales cérébrales immortalisées, déposées sous le n° I-11142, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes.

18°) Utilisation selon la revendication 16, caractérisée en ce que ladite lignée de cellules endothéliales est une des lignées de cellules endothéliales cérébrales selon l'une quelconque des revendications 1 à 11.

19°) Application des lignées de cellules endothéliales de mammifères, constituées par des cellules endothéliales cérébrales immortalisées, comprenant un fragment d'acide nucléique incluant au moins un fragment immortalisant d'un oncogène viral ou cellulaire, éventuellement associé à au moins un gène de sélection, et éventuellement un vecteur d'expression comprenant une séquence codant pour un polypeptide, une protéine ou un vecteur viral, éventuellement associé à au moins un gène de sélection et éventuellement au moins un gène marqueur, pour

l'obtention d'un médicament pour stimuler la croissance et la reproduction des animaux d'élevage.

20°) Modèle d'étude de l'intégration cérébrale de cellules vectrices de substances actives, au niveau du 5 cerveau, caractérisé en ce qu'il comprend une lignée cellulaire selon la revendication 8 ou la revendication 9.

1/13

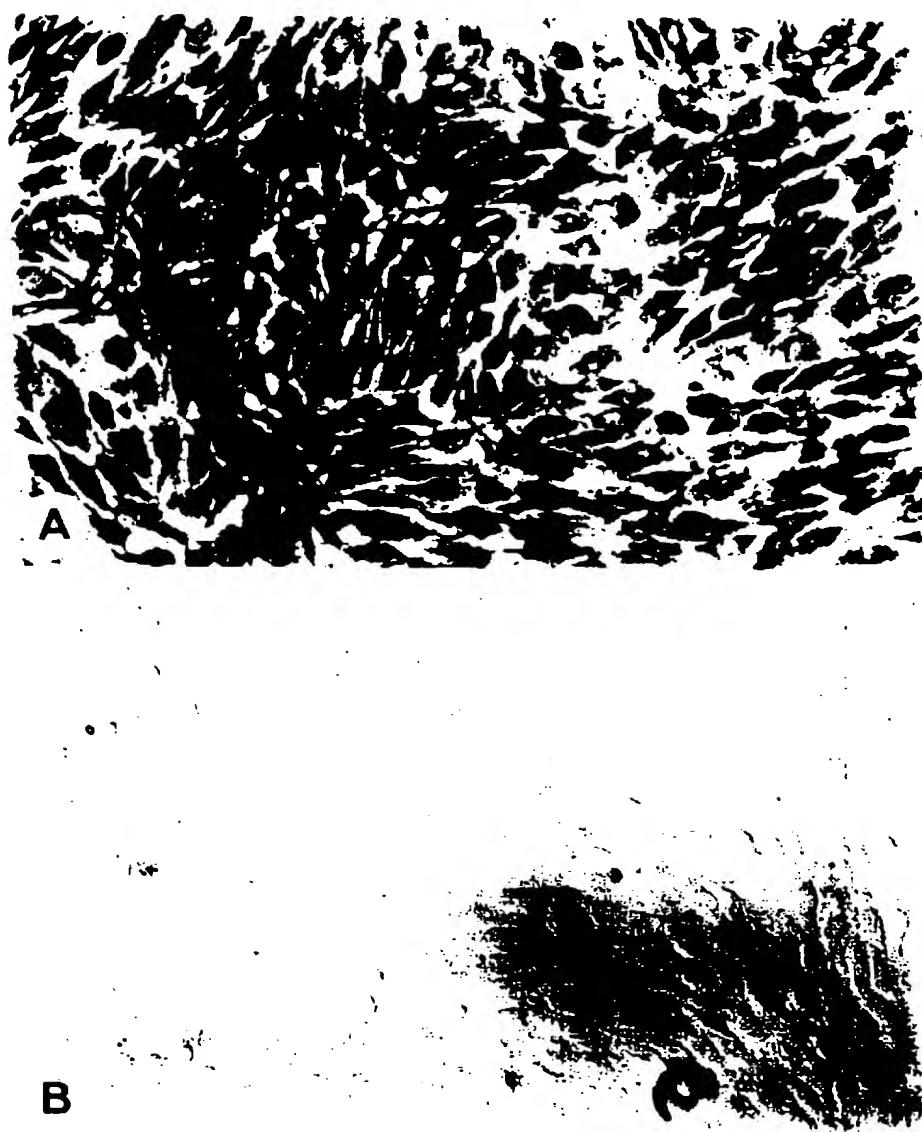


FIG. 1

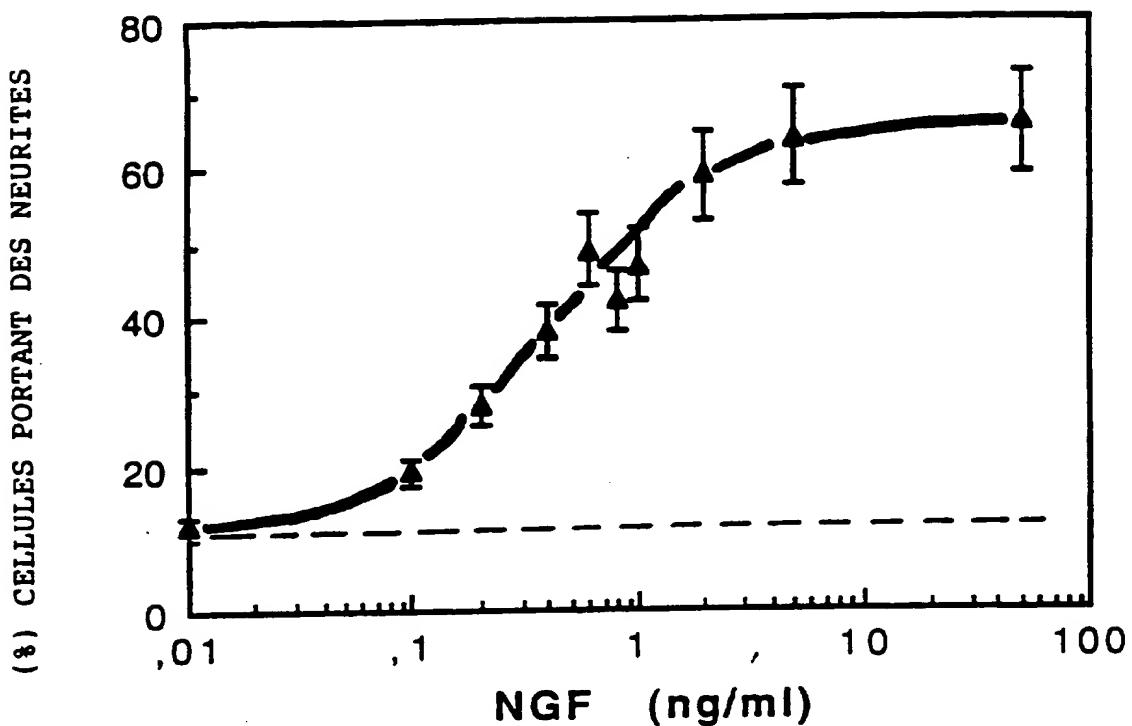


FIG. 2

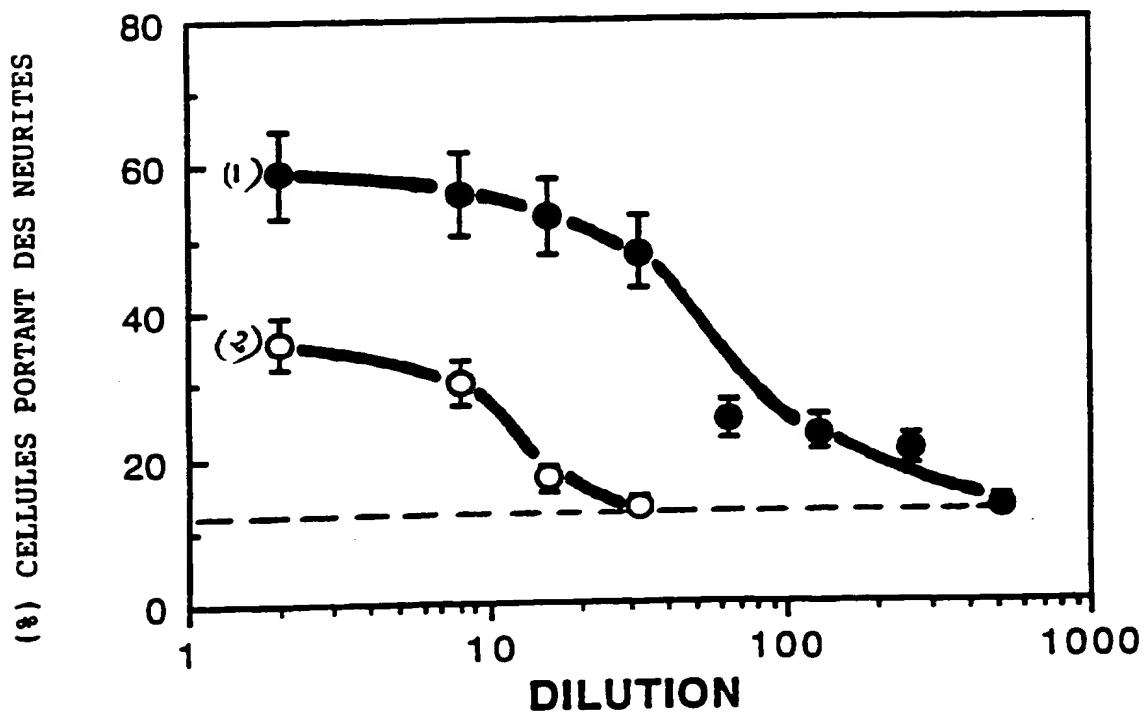


FIG. 3

3 / 13

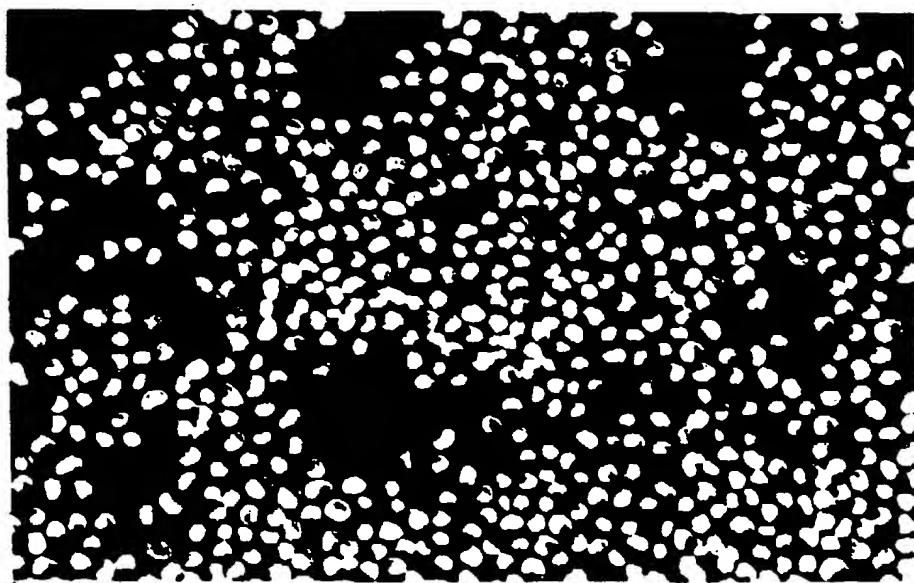


FIG. 4

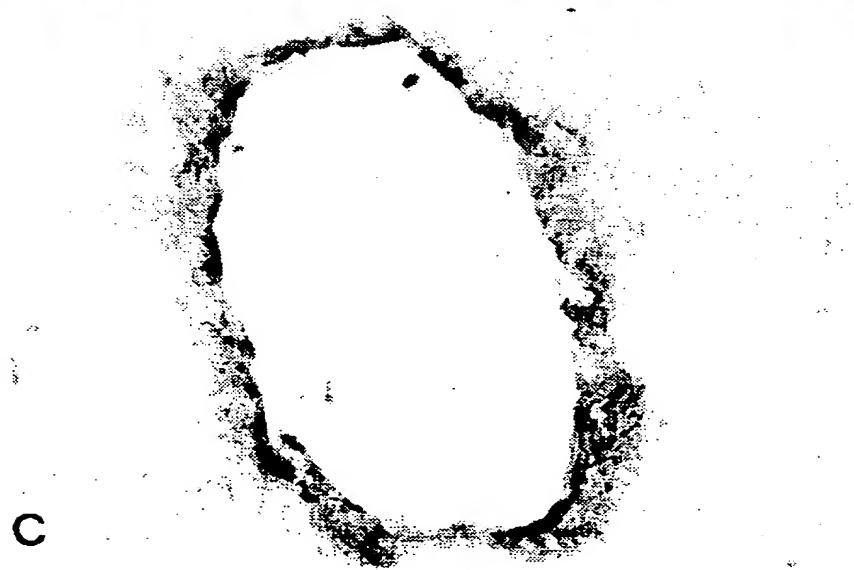
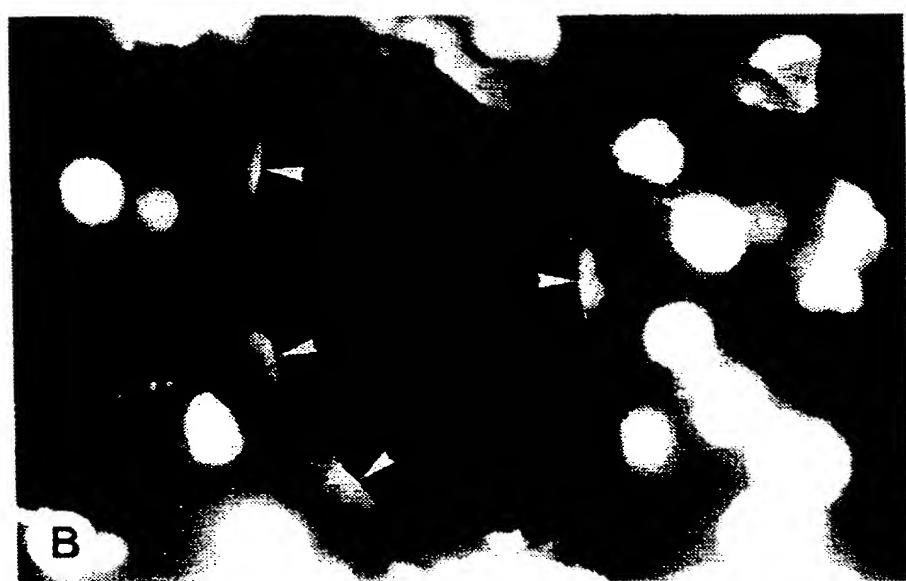
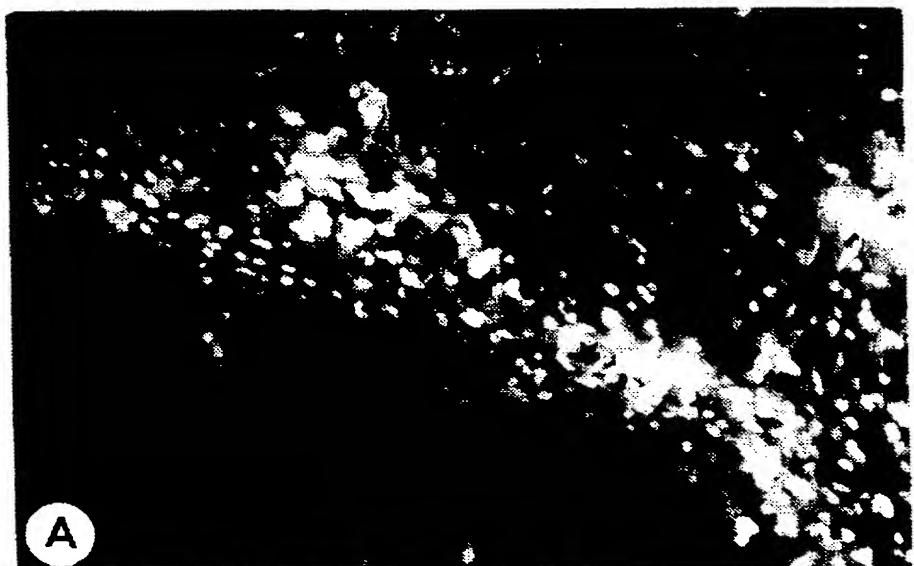
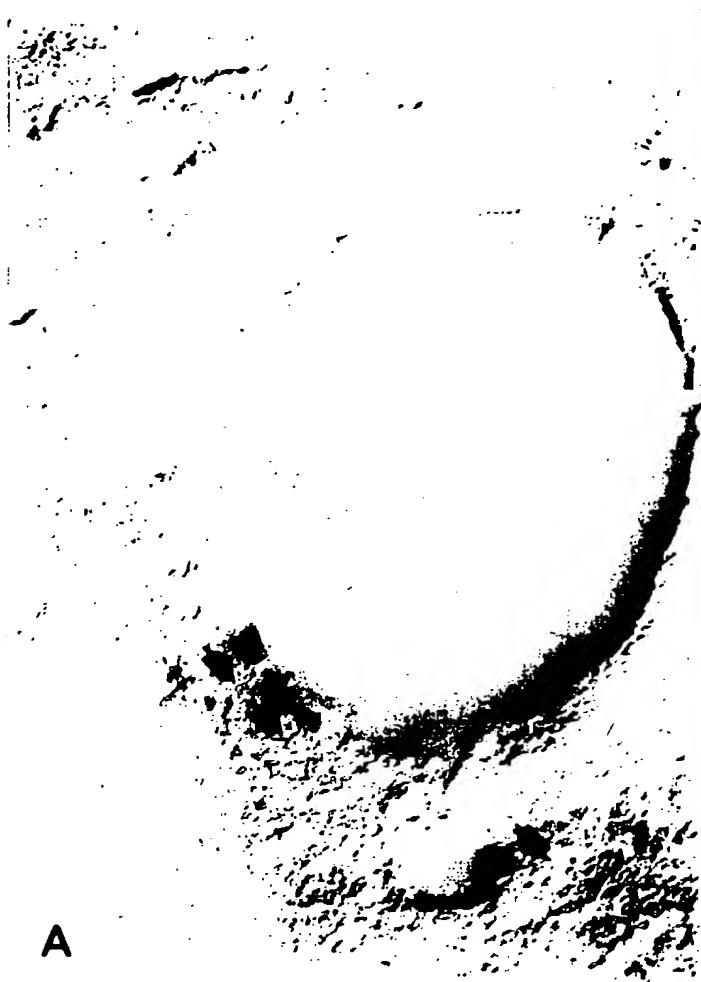


FIG. 5

5/13



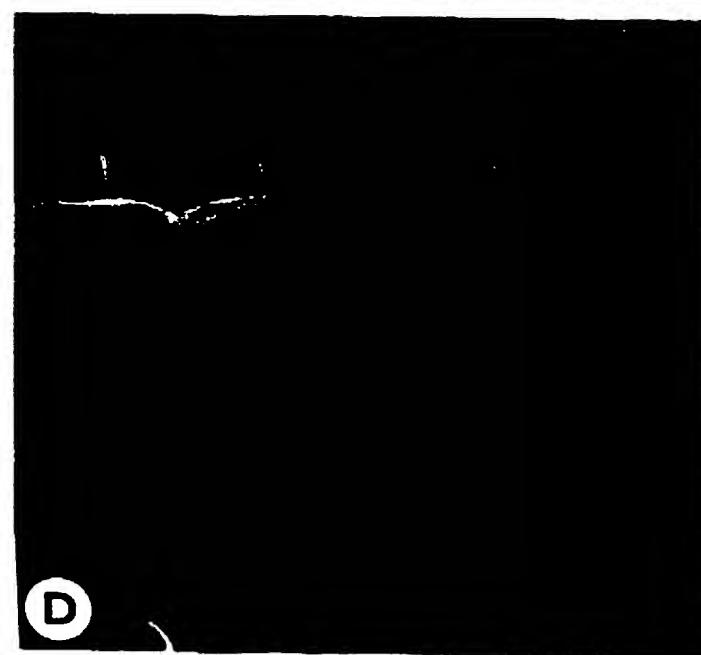
A



B



C



D

FIG. 6:

6/13



FIG. 7

7/13

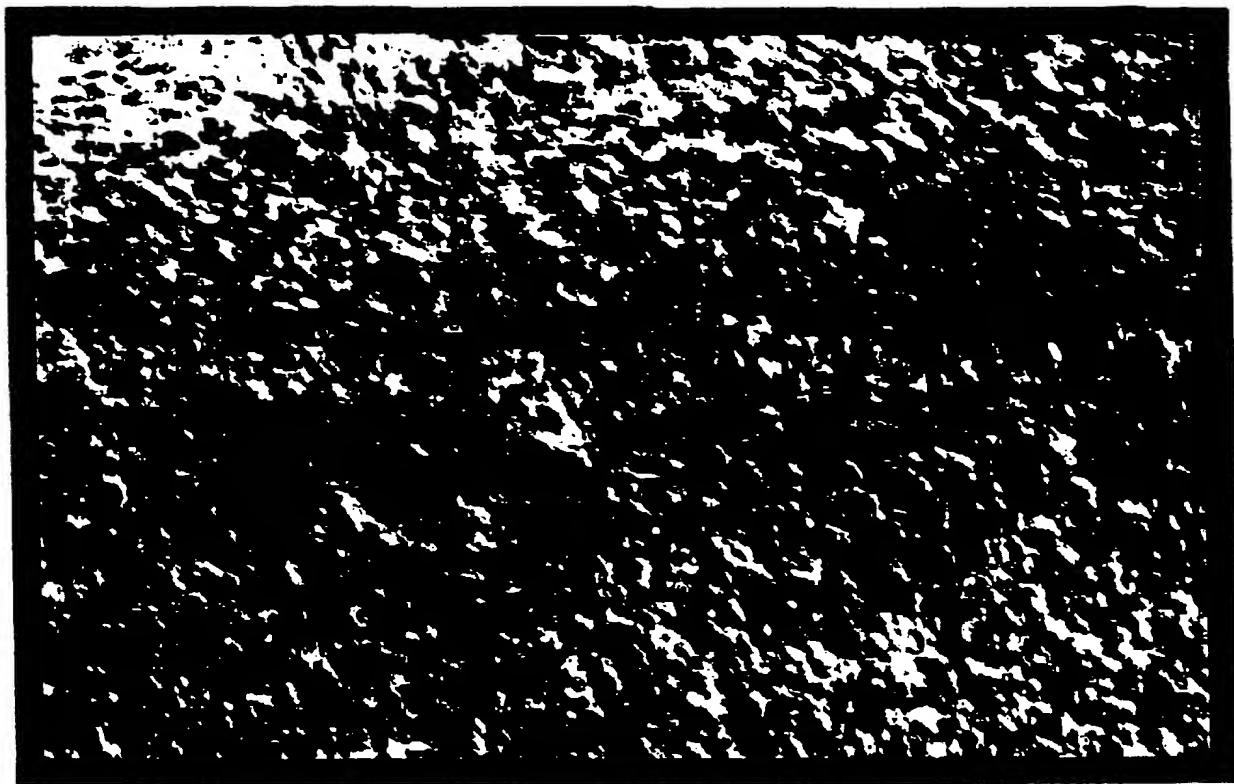


FIG. 8

8/13



FIG. 9.

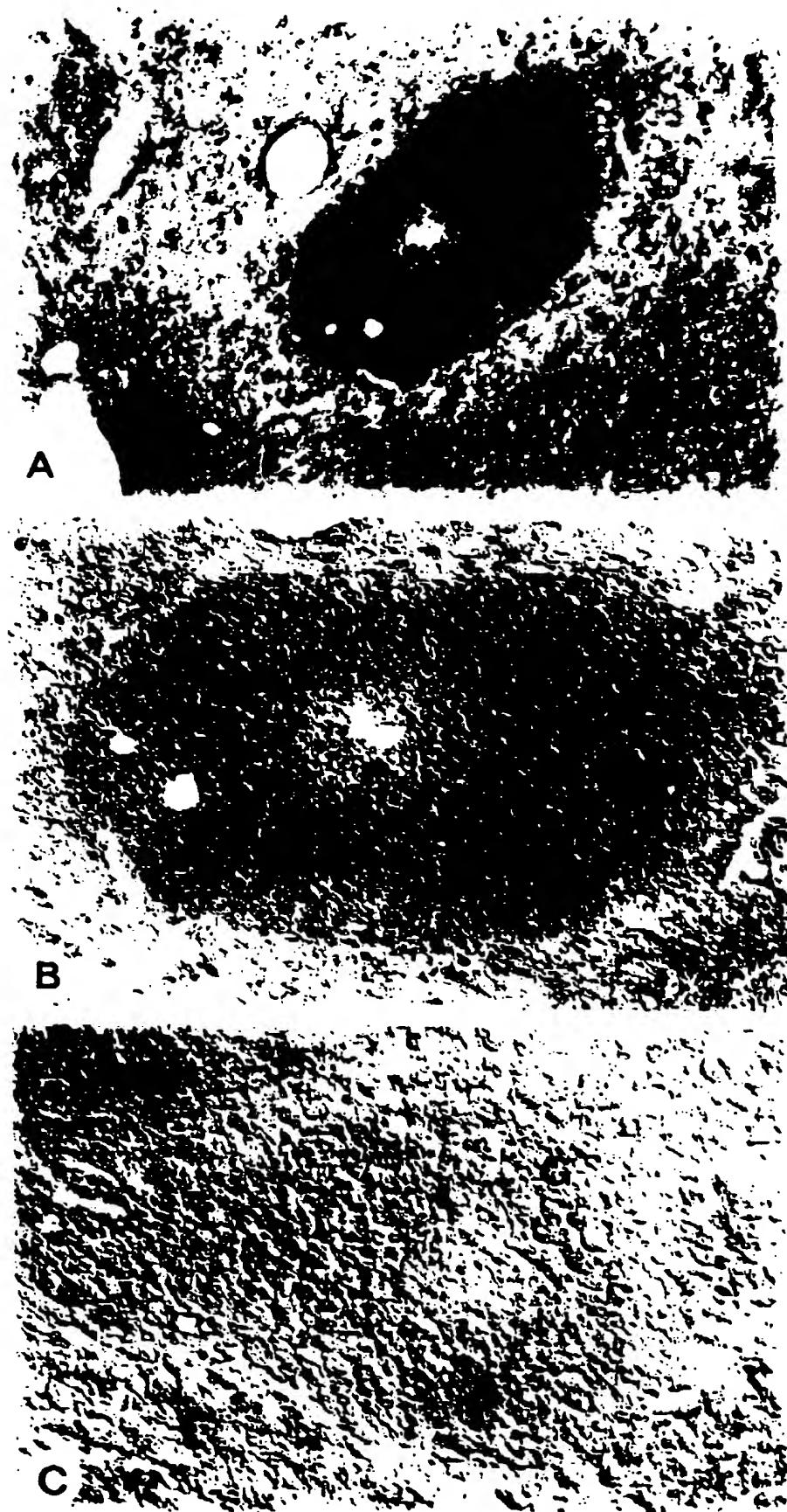


FIG. 10

10/13



FIG. 11

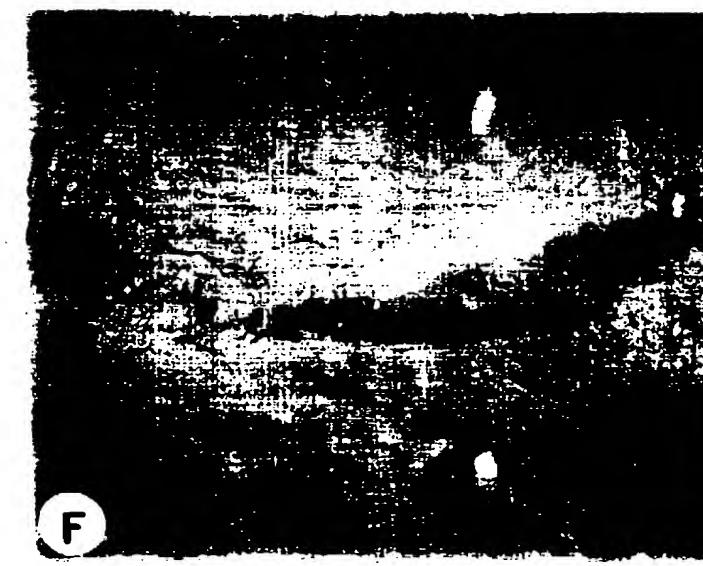
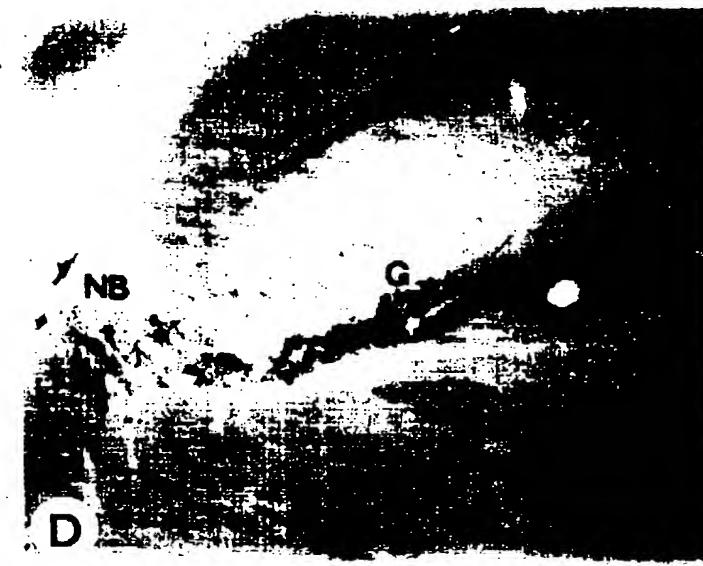
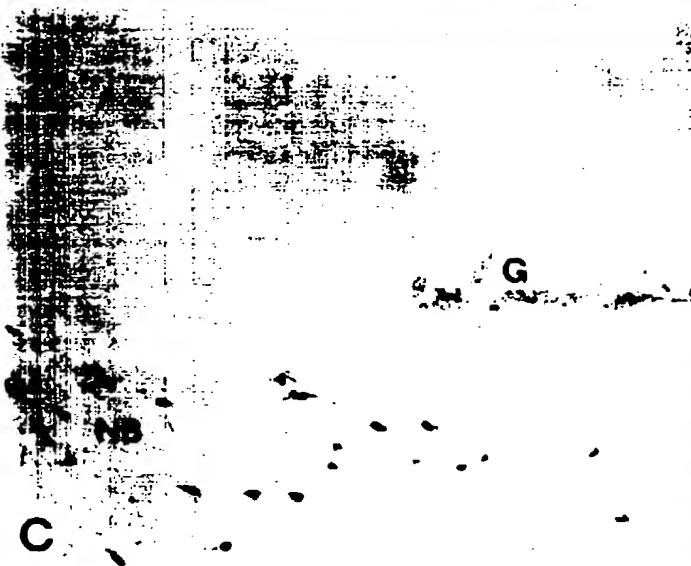


FIG. 12

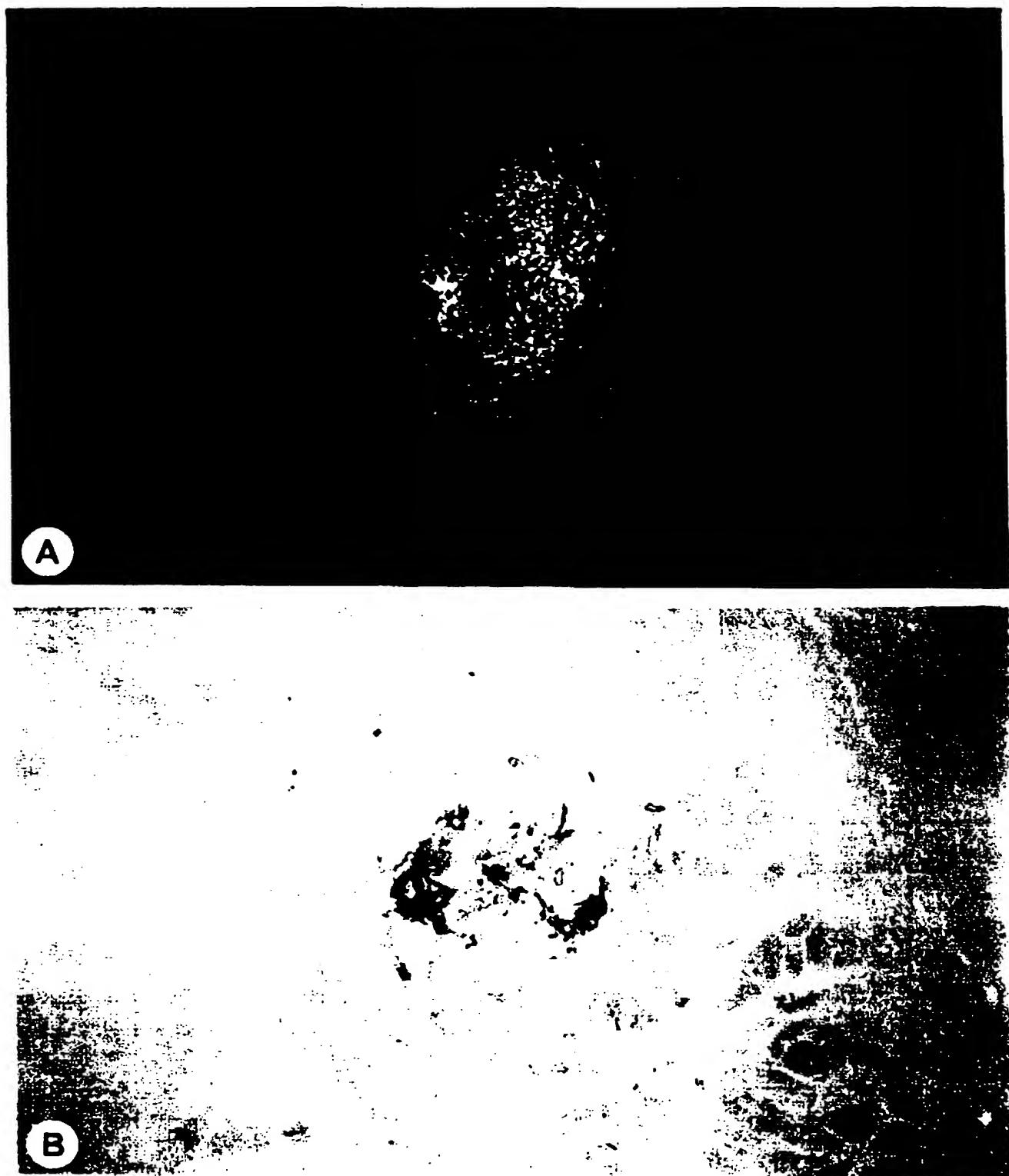


FIG. 13

13/13

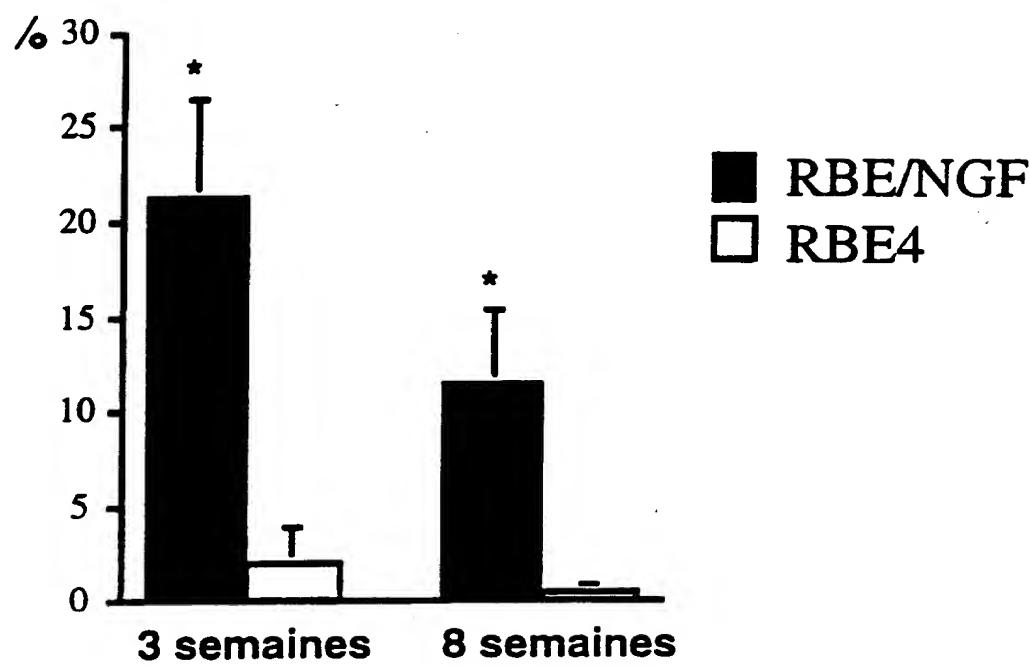


FIG. 14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/FR 95/01313

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C12N15/86 C12N5/10 A61K48/00 C07K14/48 C07K14/075
 C07K14/82

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 6 C12N A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol. 91, no. 21, 11 October 1994 WASHINGTON US, pages 9695-9699, LAL, B. ET AL. 'Endothelial cell implantation and survival within experimental gliomas' see the whole document ---	1,3-5,7, 8,12-16, 18,20
Y	WO,A,93 06222 (CNRS) 1 April 1993 cited in the application see the whole document ---	1-20
Y	WO,A,89 05345 (WHITEHEAD INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH) 15 June 1989 see page 31, line 22 - page 32, line 3; claims ---	1-20

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- '&' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 February 1996

Date of mailing of the international search report

01.03.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Chambonnet, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 95/01313

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO,A,94 10305 (SANDOZ-ERFINDUNGEN VERWALTUNGSGESELLSCHAFT M.B.H.) 11 May 1994 see the whole document ---	1-20
Y	WO,A,93 13807 (GEORGETOWN UNIVERSITY) 22 July 1993 see page 2, line 4 - page 5, line 15; claims 1-3,6-8,11,12,16 ---	1-20
A	WO,A,92 17569 (DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES USA) 15 October 1992 see the whole document ---	1
A	WO,A,92 07573 (SOMATIX THERAPY CORPORATION) 14 May 1992 see the whole document ---	1
A	WO,A,93 14193 (YALE UNIVERSITY) 22 July 1993 see the whole document ---	1
A	IN VITRO CELL. DEV. BIOL., vol. 27A, October 1991 pages 771-778, DURIEU-TRAUTMANN, O. ET AL. 'Immortalization of brain capillary endothelial cells with maintenance of structural characteristics of the blood-brain barrier endothelium' see the whole document ---	1
A	JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY, vol. 157, 1993 pages 41-51, VICART, P. ET AL. 'Cell adhesion markers are expressed by a stable human endothelial cell line transformed by the SV40 Large T antigen under vimentin promoter control' see the whole document -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter Application No
PC1/FR 95/01313

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9306222	01-04-93	FR-A-	2681609	26-03-93
WO-A-8905345	15-06-89	AT-T- DE-D- DE-T- EP-A- JP-T-	110108 3851153 3851153 0391960 3505036	15-09-94 22-09-94 05-01-95 17-10-90 07-11-91
WO-A-9410305	11-05-94	AU-B- CA-A- EP-A- FI-A- NO-A-	5440494 2143489 0669977 952088 951628	24-05-94 11-05-94 06-09-95 02-05-95 03-07-95
WO-A-9313807	22-07-93	AU-B-	3429993	03-08-93
WO-A-9217569	15-10-92	AU-B- EP-A- JP-T-	1765992 0578769 6509467	02-11-92 19-01-94 27-10-94
WO-A-9207573	14-05-92	AU-B- AU-B- AU-B- AU-B- CA-A- CA-A- EP-A- EP-A- JP-T- JP-T- WO-A-	659824 1266692 656544 9017591 2095153 2095256 0568537 0556345 7503121 6503968 9207943	01-06-95 26-05-92 09-02-95 26-05-92 01-05-92 01-05-92 10-11-93 25-08-93 06-04-95 12-05-94 14-05-92
WO-A-9314193	22-07-93	US-A- AU-B-	5336615 3478193	09-08-94 03-08-93